

**UNIVERSITE MONTPELLIER II  
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

**T H E S E**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER 2**

***Discipline : Virologie***

***Spécialité : Biologie-Santé***

***Ecole Doctorale : Sciences chimiques et biologiques pour la santé***

présentée et soutenue publiquement

par

**Carine Lidianne HOLZ**

Le 04 novembre 2011

**Dynamique de l'émergence *in vitro* des mutants d'échappement du  
virus de la peste des petits ruminants (PPRV) face à l'activité ARN interférente  
ciblant le gène de la nucléoprotéine : implications pour les stratégies  
thérapeutiques**

Thèse dirigée par le docteur **Emmanuel ALBINA** et encadrée par le docteur **Renata SERVAN DE  
ALMEIDA**

**JURY**

<b>Docteur Stéphane BERTAGNOLI</b> , ENVT-INRA, Université de Toulouse II	Rapporteur
<b>Docteur Frédéric TANGY</b> , Institut Pasteur, Paris	Rapporteur
<b>Docteur Gilles DIVITA</b> , CNRS-Université de Montpellier II	Examineur
<b>Docteur Noël TORDO</b> , Institut Pasteur, Lyon	Examineur
<b>Docteur Renata SERVAN DE ALMEIDA</b> , Cirad-INRA, Montpellier	Membre invité
<b>Docteur Geneviève LIBEAU</b> , Cirad-INRA, Montpellier	Membre invité

**UNIVERSITE MONTPELLIER II  
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

**T H E S E**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER 2**

***Discipline : Virologie***

***Spécialité : Biologie-Santé***

***Ecole Doctorale : Sciences chimiques et biologiques pour la santé***

présentée et soutenue publiquement

par

**Carine Lidianne HOLZ**

Le 04 novembre 2011

**Dynamique de l'émergence *in vitro* des mutants d'échappement du  
virus de la peste des petits ruminants (PPRV) face à l'activité ARN interférente  
ciblant le gène de la nucléoprotéine : implications pour les stratégies  
thérapeutiques**

Thèse dirigée par le docteur **Emmanuel ALBINA** et encadrée par le docteur **Renata SERVAN DE  
ALMEIDA**

**JURY**

<b>Docteur Stéphane BERTAGNOLI</b> , ENVT-INRA, Université de Toulouse II	Rapporteur
<b>Docteur Frédéric TANGY</b> , Institut Pasteur, Paris	Rapporteur
<b>Docteur Gilles DIVITA</b> , CNRS-Université de Montpellier II	Examineur
<b>Docteur Noël TORDO</b> , Institut Pasteur, Lyon	Examineur
<b>Docteur Renata SERVAN DE ALMEIDA</b> , Cirad-INRA, Montpellier	Membre invité
<b>Docteur Geneviève LIBEAU</b> , Cirad-INRA, Montpellier	Membre invité

# **Dynamique de l'émergence *in vitro* des mutants d'échappement du virus de la peste des petits ruminants (PPRV) face à l'activité ARN interférente ciblant le gène de la nucléoprotéine : implications pour les stratégies thérapeutiques**

## **Résumé**

Les membres du genre *Morbillivirus*, famille *Paramyxoviridae* sont responsables de graves maladies chez l'homme et les animaux, comme la rougeole, la peste bovine (RP) et la peste des petits ruminants (PPR). Malgré l'existence de vaccins efficaces contre ces maladies, des traitements spécifiques sont souhaitables. L'inhibition de la réplication de ces virus peut être acquise par interférence ARN (ARNi), un mécanisme d'inhibition post-transcriptionnel déclenché par des séquences courtes d'ARN double-brin (siARN). Le Cirad a précédemment identifié 3 siARNs ciblant des régions conservées du gène de la nucléoprotéine virale capables d'inhiber au moins 80% de la réplication *in vitro* des virus de la rougeole, de la RP et de la PPR. Cependant, un problème majeur dans la stratégie d'ARNi est le risque d'apparition de virus résistants. Dans cette étude, nous avons évalué le risque d'apparition de mutants d'échappement du virus de la PPR sous pression de sélection de 3 siARNs appliqués seul ou en association après plusieurs transfections successives *in vitro*. Excepté pour la combinaison des 3 siARNs, le virus a échappé à l'ARNi après 3 à 20 passages consécutifs, avec des mutations simples ou multiples (synonymes ou pas) ou une délétion de 6 nucléotides dans la zone cible des siARN. Ces résultats mettent en évidence une plasticité génomique inattendue des morbillivirus surtout illustrée par cette délétion non-délétère d'une partie significative d'un gène viral essentiel, qui devrait être considérée comme un obstacle à l'utilisation de l'ARNi comme thérapie antivirale. Cependant, l'utilisation combinée de 3 siARNs peut être proposée pour diminuer le risque d'échappement aux siARNs.

---

**Mots Clés :** Morbillivirus, virus de la peste des petits ruminants (PPRV), interférence ARN (ARNi), siARN, virus d'échappement, thérapie antiviral, malleabilité génomique.

---

# **Dynamics of the *in vitro* emergence of escape mutants of the peste des petits ruminants virus (PPRV) to interfering RNAs targeting the nucleoprotein gene: implications for therapeutics**

## **Abstract**

Viruses in the genus *Morbillivirus*, within the family *Paramyxoviridae* are responsible for severe humans and animal diseases, including measles, rinderpest (RP) and peste des petits ruminants (PPR). In spite of the existence of efficient vaccines against these diseases, specific treatments to be applied when the *infection is already present* are desirable. Inhibition of morbillivirus replication can be achieved by RNA interference (RNAi), a mechanism of post-transcriptional gene silencing triggered by small double-stranded RNA (siRNA). The Cirad previously identified three siRNAs that target conserved regions of the essential gene encoding the viral nucleoprotein and are able to prevent *in vitro* at least 80% of the replication of measles, RP and PPR viruses. However, a major problem in RNAi is the important risk of emergence of escape mutants. In this study, we investigated the ability of PPR virus to escape the inhibition conferred by single or multiple siRNAs after several consecutive transfections *in vitro*. Except with the combination of the three different siRNAs, the virus systematically escaped RNAi after 3 to 20 consecutive passages. The mutations were characterized by either single or multiple punctual nucleotide mutations (synonymous or not) or a deletion of a stretch of 6 nucleotides into the siRNA target. These results demonstrate that the genomic plasticity of morbilliviruses, illustrated mainly by this significant and non-deleterious deletion in an essential viral gene, should be considered as an obstacle to the use of RNAi in antiviral therapy. However, the combined use of three siRNAs can be proposed to prevent treatment failure with siRNAs.

---

**KEYWORDS:** Morbillivirus, peste des petits ruminants virus (PPRV), RNA interference (RNAi), siRNA, escape virus, antiviral therapy, genomic malleability.

---

**Carine L. HOLZ**

**Laboratoire :** Cirad – Département Systèmes Biologiques, UMR 15 “Contrôle des Maladies Animales Exotique et Emergentes”, équipe de virologie, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier, cedex 5, France.

## Remerciements

Je voudrais remercier très sincèrement les membres du jury, Madame Renata SERVAN DE ALMEIDA, Messieurs Stéphane BERTAGNOLI, Gilles DIVITA, Frédéric TANGY, Noël TORDO, qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude tout particulièrement à Renata SERVAN DE ALMEIDA pour m'avoir donné l'opportunité de venir faire ce doctorat en France. Je voudrais la remercier pour sa disponibilité constante aussi bien au laboratoire qu'en dehors du travail. Un grand merci pour son soutien, sa confiance, sa gentillesse, ses conseils techniques et principalement pour son amitié.

Je tiens à remercier également Emmanuel ALBINA d'avoir accepté d'être directeur de thèse et de m'avoir permis d'intégrer le service de virologie pendant ces trois belles années. Merci de m'avoir fait confiance et d'avoir suivi ce travail dans ces moindres détails.

Je remercie Dominique MARTINEZ, responsable de l'unité mixte de recherche UMR 15 « contrôle des maladies animales exotiques et émergentes », auquel appartient le service de virologie, de m'avoir accueilli dans l'unité.

Un grand merci à tous ceux et celles qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail :

- *Cécile*, un grand merci pour ton aide précieuse avec les manip et tes conseils techniques. Je tiens à te remercier particulièrement pour ta disponibilité,
- *Olivier*, merci pour tes conseils techniques mais également pour ta disponibilité, ta bonne humeur et ta patience inépuisable. Merci surtout de ton amitié,
- *Renaud Lancelot*, merci de ton aide pour les analyses de mes données,
- Merci également à *Anne Xuerèb*, *Philippe Gauthier* et *Maxime Galan*, pour votre aide et conseils pour la mise au point de la PCR-HRM.

Je tiens à remercier particulièrement le personnel de l'UMR15 et toutes les personnes travaillant au bâtiment G.

- *Geneviève*, merci pour ton intéressement à mon travail et pour tes conseils techniques,
- Un merci spécial aux membres et anciens membres de l'équipe de virologie : *Patricia, Philippe, Colette, Christian, Vincent, Catherine, Aurélie, Djénéba, Saliha, Emna, Zaheer et Habib*, pour les discussions techniques et vos encouragements,
- *Elvina*, merci d'avoir partagé le bureau et l'appartement avec moi et d'avoir été toujours présente et disponible quand j'avais besoin. Merci de m'avoir écouté et supporté, au sens propre comme au figuré, pendant tout ce temps,
- *Virginie*, merci de ta compagnie et de ton énorme soutien,
- *Samia*, merci pour tes encouragements et merci d'avoir partagé le bureau avec moi,
- Un grand merci également à *Lucia, Armelle, Mathieu et leurs familles respectives* pour leurs amitiés et les moments de pur bonheur qu'on a pu passer ensemble.

J'adresse également mes remerciements à mes amis pour leurs encouragements. Un merci spécial à *Helena, Juliana et Delaine* pour m'avoir toujours réservé des moments très agréables et pour me permettre d'avoir moins de « *saudades* » de mon pays.

Enfin, je voudrais remercier de tout mon cœur ma famille, et plus particulièrement mon mari qui m'a toujours soutenue. Filipe, je ne suis pas sûre de trouver les mots exacts pour exprimer mes sentiments. Merci surtout d'avoir accepté de passer trois ans dans les aller/retour Paris-Montpellier interminables. Merci aussi de m'avoir aidé à préparer les fichiers sur Excel.

Merci à mes parents, mes sœurs et ma belle-famille qui, malgré la distance, ont toujours été là pour moi. Ils ont toujours su m'épauler et m'encourager.

Merci également à la Région Languedoc Roussillon et au Cirad pour avoir supporté financièrement ce travail.

A tous, un grand merci !

# Table de matiere

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>4</b>
<b>ABREVIATIONS .....</b>	<b>9</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>12</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>14</b>
<b>1 INTRODUCTION .....</b>	<b>15</b>
<b>2 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>17</b>
2.1 LES MORBILLIVIRUS .....	17
2.1.1 Classification .....	17
2.1.2 Structure virale et organisation génomique .....	18
2.1.3 Les protéines virales .....	20
2.1.3.1 Les protéines structurales .....	21
2.1.3.1.1 La nucléoprotéine (N) .....	22
2.1.3.1.2 La phosphoprotéine (P) .....	24
2.1.3.1.3 La polymérase (L) .....	25
2.1.3.1.4 La protéine de matrice (M) .....	25
2.1.3.1.5 L'hémagglutinine (H) .....	25
2.1.3.1.6 La protéine de fusion (F) .....	26
2.1.3.2 Les protéines non structurales .....	26
2.1.3.2.1 La protéine C .....	27
2.1.3.2.2 La protéine V .....	27
2.1.4 Réplication virale .....	28
2.1.5 Propriétés physico-chimiques .....	29
2.1.6 Morbillivirus des humains .....	30
2.1.6.1 Virus de la rougeole ( <i>measles virus</i> - MV) .....	30
2.1.7 Morbillivirus des ruminants .....	35
2.1.7.1 Virus de la peste bovine (PBV) ou rinderpest virus (RPV) .....	35
2.1.7.2 Virus de la peste des petits ruminants (PPRV) .....	40
2.1.7.2.1 Description de la maladie .....	40
2.1.7.2.2 Répartition géographique .....	41
2.1.7.2.3 Épidémiologie .....	44
2.1.7.2.4 Pathogénie .....	45
2.1.7.2.5 Diagnostic .....	49
2.1.7.2.6 Contrôle et traitements .....	52
2.2 L'INTERFERENCE ARN (ARNi) .....	55
2.2.1 Historique .....	55

2.2.2	Mécanisme d'interférence par les siARN.....	57
2.2.3	Le choix de la séquence cible des siARNs.....	61
2.2.4	Applications de l'interférence ARN.....	63
2.2.5	L'interférence ARN comme lutte antivirale.....	64
2.2.6	Les difficultés à surmonter dans l'utilisation de l'interférence ARN .....	65
2.2.6.1	Les réponses interféron.....	65
2.2.6.2	Effet hors-cible ( <i>off-targets</i> ) des siARNs .....	66
2.2.6.3	Suppresseurs viraux de l'ARNi.....	66
2.2.6.4	Saturation des composants de la voie endogène de l'ARNi .....	68
2.2.6.5	La délivrance <i>in vivo</i> .....	68
2.2.6.6	Emergence des virus d'échappement.....	71
<b>3</b>	<b>PROBLEMATIQUE ET OBJETIF .....</b>	<b>75</b>
<b>4</b>	<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>76</b>
4.1	CELLULES, VIRUS, ET SIARNs.....	76
4.2	TRANSFECTION DES SIARNs ET INFECTION VIRALE.....	77
4.3	IMMUNOFLUORESCENCE (IF).....	78
4.4	EVALUATION DE L'EFFICACITE DES SIARNs (siNPPRV1, siNPPRV6 ET siNPPRV7) FACE AUX SOUCHES SAUVAGES DE PPRV DISPONIBLES AU LABORATOIRE DE VIROLOGIE DU CIRAD .....	79
4.5	EXTRACTION DE L'ARN TOTAL, RT-PCR ET SEQUENÇAGE .....	80
4.6	HIGH RESOLUTION MELTING REAL-TIME PCR (PCR-HRM).....	80
4.7	VERIFICATION DU ROLE DES MUTATIONS/DELETION DANS LA RESISTANCE A L'INTERFERENCE ARN .....	81
4.8	ALIGNEMENTS.....	83
4.9	ANALYSES DES SEQUENCES .....	84
4.10	ANALYSES STATISTIQUES .....	86
<b>5</b>	<b>RESULTATS .....</b>	<b>88</b>
5.1	EFFET DOSE DEPENDANT DES SIARNs CIBLANT DES REGIONS CONSERVEES DU GENE N .....	88
5.2	EVALUATION DE L'EFFICACITE DES SIARNs (siNPPRV1, siNPPRV6 ET siNPPRV7) FACE AUX SOUCHES SAUVAGES DE PPRV DISPONIBLES AU LABORATOIRE DE VIROLOGIE DU CIRAD .....	91
5.3	EMERGENCE DES MUTANTS D'ECHAPPEMENT.....	93
5.4	CINETIQUE D'APPARITION ET DE MULTIPLICATION DES MUTANTS .....	97



5.5	CONFIRMATION DU ROLE DES MUTATIONS ET DE LA DELETION DANS L'ÉCHAPPEMENT AU S <sub>IN</sub> PPRV1 .....	99
5.6	CONSERVATION DES ZONES CIBLES ET FLANQUANTES DES SIARNs .....	101
5.7	ANALYSE DE LA VARIABILITÉ GÉNOMIQUE INDUITE PAR LES SIARNs ....	103
5.7.1	<i>Analyse dN/dS</i> .....	103
5.7.2	<i>Reconstruction phylogénétique (approche bayésienne) et horloge moléculaire</i> .....	104
5.7.3	<i>Analyse factorielle multiple (AFM)</i> .....	105
5.7.4	<i>Analyse de survie</i> .....	106
<b>6</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>109</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>115</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>117</b>
	<b>PUBLICATIONS EN RAPPORT AVEC LA THÈSE.....</b>	<b>150</b>

## **Abréviations**

aa : Acide aminé

AAV : Virus associé à l'adénovirus

ADNc : ADN complémentaire

AFM : Analyse factorielle multiple

ARNdb : ARN double brin

ARNi : Interférence ARN

ATP : Adénosine-5'-triphosphate

BVD : Diarrhée à virus des bovins

CDV : Canine distemper virus (virus de la maladie de Carré)

CHS : Chalcone synthase

CMV : Cytomégalovirus

DICC50/ml : Dose infectant 50% des cultures cellulaires

DICER : Endonucléase membre de la famille des RNases III

DIVA : Differentiation of infected and vaccinated animals

EBV : Epstein-barr virus

ECP : Effet cythopathique

EMPRES : Système de prévention et de réponse rapide contre les ravageurs et les maladies transfrontières des animaux et des plantes

F : Protéine de fusion

FAO : Food and Agriculture Organization

GREP : Programme mondial d'éradication de la peste bovine

H : Protéine de l'hémagglutinine

HIV-1 : Human immunodeficient virus type 1 (virus de l'immunodéficience humaine)

IF : Immunofluorescence

IF-1 : Interféron de type 1

InVS : Institut de Veille Sanitaire

M : Protéine de la matrice

mAc : anticorps monoclonal

MEM : Milieu essentiel minimum d'Eagles

miARN : micro ARN

MOI : Multiplicité d'infection (Multiplicity of infection)

MV : Measles virus (virus de la rougeole)

N : Nucléoprotéine

OIE : Organisation mondiale des épizooties

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P : Phosphoprotéine

PB : Peste bovine

PBS : Phosphate buffered saline ou tampon phosphate salin

PCR-HRM : *High-resolution melting* real-time PCR

PDV : Phocine distemper virus (morbillivirus des phoques)

PPR : Peste des petits ruminants

PPRV : Virus de la peste des petits ruminants

pre-miARN : Précurseur de micro ARN

p/s/cm<sup>2</sup>/sr : Photons/s/cm<sup>2</sup>/steradian

QPCR : Quantitative PCR (PCR quantitative ou PCR en temps réel)

RdRp : RNA-directed RNA polymerase

RISC : RNA-induced silencing complex

RNAi : Interférence ARN

RNP : Ribonucléoprotéine

RPV : Rinderpest virus (virus de la peste bovine)

RSV : Virus respiratoire syncytial

RT-PCR : reverse transcription-PCR

SLAM : Signalling lymphocyte activation molecule

siARN : Small interfering RNA (petits ARN interférent)

SVF : Sérum de veau fœtal

SV40 : Virus simien 40

TLR : Toll like receptor

UNICEF : The United Nations children's fund

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VHB : Virus de l'hépatite B

VHC : Virus de l'hépatite C

## Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Arbre phylogénétique des différents morbillivirus basé sur une séquence partielle du gène de la phosphoprotéine P (d'après Barrett, 1999, modifié).	18
2	Structure et organisation génomique d'un <i>Morbillivirus</i> .	19
3	La nucléoprotéine virale des morbillivirus	23
4	Cycle de l'infection par les morbillivirus (d'après Gerlier et al., 2007).	29
5	Symptôme classique de la rougeole.	31
6	Carte des 47 pays prioritaires pour la réduction de la mortalité due à la rougeole (d'après les données de l'OMS).	33
7	Nombre de cas de rougeole survenus en France et taux d'incidence par départements en 2010 (d'après l'InVS).	35
8	Evolution de la répartition géographique de la peste bovine.	37
9	Symptômes de la peste bovine.	39
10	Distribution géographique des différentes lignées du PPRV.	42
11	Arbre Phylogénétique des différentes souches de PPRV basé sur une séquence partielle du gène de la nucléoprotéine (d'après Banyard et al., 2010).	43
12	Signes cliniques des animaux atteints de la peste des petits ruminants (d'après Roeder et al., 2000).	46
13	Lésions macroscopiques des animaux atteints de la peste des petits ruminants.	48
14	Variation de la couleur des pétunias en fonction de l'extinction du gène de la pigmentation par l'interférence ARN.	56
15	Schéma de la structure d'un siARN.	57
16	Mécanisme d'action des siARN.	59
17	Mécanisme d'action des siARN induits artificiellement dans les cellules de mammifères.	61
18	Niveau de perte d'inhibition de l'interférence ARN après mutation de	73

chaque nucléotide de la séquence cible (d'après Pusch et al., 2003).

19	Schéma d'une plaque de transfection.	78
20	Plasmide rapporteur siRNA-NPPR1-Firefly_Luciferase-2 (Nizamani, 2010).	82
21	Détection de la N par immunofluorescence et observation de l'ECP.	89-90
22	Délétion observée après 15 transfections successives <i>in vitro</i> sous pression de sélection du siNPPRV1.	96
23	Résultats du <i>high-resolution melting</i> real-time PCR (PCR-HRM).	98
24	Signal de bioluminescence des plasmides rapporteurs avec la séquence cible du siNPPRV1 non muté ou muté face au siNPPRV1 non muté ou muté.	99
25	Activité de différents siARNs sur différentes cibles <i>in vitro</i> .	100
26	Conservation des zones cibles et des régions flanquantes des siARN N1, N6 et N7.	102
27	Analyse dN/dS des souches sauvages du virus PPRV (en rouge) et des souches sauvages combinées avec les mutants d'échappements obtenus après transfections successives sous pression de sélection des siARN (bleu).	104
28	Arbre de reconstruction phylogénétique obtenue par l'approche bayésienne.	105
29	Groupes de PPRV sauvages (W) et mutants siARN-induits (M) selon leurs séquences nucléotidiques.	106
30	Probabilité de survie (ou d'absence de mutation) de la souche du PPRV vaccinal Nigéria 75/1 sous pression de sélection exercée par différents siARNs.	108

## Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Principaux agents pathogènes du genre <i>Morbillivirus</i> (d'après Banyard et al., 2006).	17
2	Les protéines d'un <i>Morbillivirus</i> (d'après Dufour, 2010).	21
3	Principales caractéristiques pour le diagnostic différentiel de la PPR (Diallo, 2005).	50
4	Caractéristiques des techniques de diagnostic de la PPR (d'après Diallo, 2005).	52
5	Les essais cliniques de thérapie antivirale basés sur l'ARNi (d'après Davidson & McCray Jr., 2011).	65
6	Suppresseurs viraux de l'ARNi.	67
7	siARNs utilisés dans ce travail.	77
8	Souches de PPRV disponibles dans le labo de virologie du Cirad	79
9	Couples d'amorces utilisés pour l'introduction des mutations et de la délétion dans la zone cible du siNPPRV1 présente dans le plasmide rapporteur siRNA-NPPR1-Firefly_Luciferase-2.	82
10	Souches de PPRV utilisées dans les analyses de séquences du gène N.	84
11	Efficacité des siARNs (siNPPRV1, siNPPRV6 et siNPPRV7) face aux souches sauvages du PPRV disponibles au laboratoire de virologie du Cirad et analyse des séquences de 3 zones ciblées.	92
12	Mutations et délétion observées face aux siARNs <i>in vitro</i> .	94-95

## 1 INTRODUCTION

Les morbillivirus font partie de la famille *Paramyxoviridae*, virus à ARN monocaténaire de polarité négative (Gibbs et al., 1979 ; Banyard et al., 2006 ; Diallo et al., 2007). Ils sont responsables de maladies très contagieuses et sévères chez l'homme et chez l'animal telles que la rougeole, la peste bovine (PB) et la peste des petits ruminants (PPR). Les virus de cette famille sont antigéniquement très proches avec des réactions sérologiques croisées possibles. La rougeole est considérée au niveau mondial comme la principale cause de mortalité induite par des maladies pouvant être contrôlées par la vaccination (de Quadros et al., 2003). Elle affecte essentiellement les enfants des populations les plus démunies en raison principalement de la difficulté à distribuer le vaccin (Katz, 1995). La peste bovine et la peste des petits ruminants sont des maladies qui affectent les ruminants domestiques et sauvages et entraînent des taux de mortalité souvent élevés. La PB a été considérée pendant des siècles comme la plus importante de toutes les maladies des ruminants en raison de la forte mortalité qu'elle peut entraîner. Son éradication était depuis fort longtemps au cœur des priorités des organisations internationales en charge des questions de santé animale. Le 25 mai 2011, l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) déclare la peste bovine éradiquée de la surface de la terre. Elle devient ainsi la première maladie animale à avoir été éradiquée par l'homme. Jusqu'à présent une seule maladie humaine a été éradiquée : la variole en 1980. En revanche, la peste des petits ruminants est en pleine expansion. Décrite pour la première fois en 1942 en Côte d'Ivoire (Gargadennec & Lalanne, 1942), son aire de répartition géographique est en expansion depuis quelques décennies. Initialement cantonnée en Afrique occidentale, la maladie est désormais présente dans de nombreux territoires d'Afrique, du Moyen-Orient et d'Asie. Sa récente extension au nord du Sahara fait que l'introduction de cette maladie en Europe est désormais un risque potentiel à ne pas négliger (Dufour et al., 2009).

Il existe des vaccins pour lutter contre l'ensemble de ces maladies. Cependant, il n'existe aucun traitement spécifique quand un foyer apparaît. Une approche prometteuse de traitement antimorbillivirus est la possibilité de bloquer l'expression des gènes de ce virus par l'interférence ARN (ARNi). L'ARNi est un mécanisme hautement conservé au cours de l'évolution et semble avoir un rôle naturel dans la régulation fine des gènes. Il permet également d'interférer avec l'expression de gènes viraux (Carmichael, 2002 ; Ding et al., 2004 ; Saksela, 2003). Il consiste à déclencher, au niveau d'une cellule cible, la dégradation sélective d'un ARN messager (ARNm) par un jeu de réactions enzymatiques impliquant



dans la cellule de petits ARN d'une vingtaine de paires de bases appelés ARN interférents (*small interfering RNA*, siARN). Lorsque l'hybridation entre siARN et l'ARNm cible est établie, un complexe enzymatique nommé RISC (*RNA-induced silencing complex*) clive l'ARNm cible, qui est ensuite dégradé et n'est plus traduit en protéine (effet de *silencing*). Ce mécanisme est très spécifique de la séquence cible (Tuschl & Borkhardt, 2002).

A l'heure actuelle, les siARN font l'objet d'un usage intensif pour étudier la fonctionnalité des gènes par inhibition de leur expression. Toutefois, les champs d'applications, hors génomique, sont très larges. Les siARN sont utilisables dans une visée thérapeutique telle que l'inhibition de l'expression d'un oncogène en cancérologie, d'un gène délétère dans le cas de maladies héréditaires, ainsi que dans les thérapies antivirales. Néanmoins, la promesse thérapeutique de cet outil est basée sur plusieurs conditions : absence de toxicité, spécificité de l'effet de *silencing*, efficacité de la délivrance *in vivo* et résistance à l'émergence de virus mutants d'échappement (Ichim *et al.*, 2004). L'échappement au traitement par des siARNs a été décrit plusieurs fois, notamment avec des virus à ARN (Boden *et al.*, 2003 ; Das *et al.*, 2004 ; Gitlin *et al.*, 2005 ; Konishi *et al.*, 2006 ; Baba *et al.*, 2008 ; von Eije *et al.*, 2008). La résistance peut se produire par une simple ou plusieurs mutations dans ou en dehors de la région cible (Gitlin *et al.*, 2005 ; Westerhout *et al.*, 2005 ; von Eije *et al.*, 2008) et jusqu'à une délétion partielle ou complète de la région cible (Westerhout *et al.*, 2005 )

L'objectif de cette étude était d'évaluer le risque d'apparition de mutants d'échappement du virus de la peste des petits ruminants sous pression de sélection de trois siARN (siNPPRV1, siNPPRV6 et siNPPRV7) préalablement identifiés par le laboratoire de virologie du Cirad.

Le présent mémoire de thèse sera divisé en quatre parties :

- La première est consacrée à la revue bibliographique et se décline en deux sous parties dont la première porte sur les morbillivirus et la seconde sur l'interférence ARN.
- La seconde partie présente la problématique et les objectifs du travail.
- La troisième partie aborde les travaux expérimentaux réalisés en commençant par les matériels et méthodes, puis les résultats obtenus et la discussion.
- La dernière partie présente les conclusions et perspectives envisagées.

## 2 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### 2.1 Les Morbillivirus

#### 2.1.1 Classification

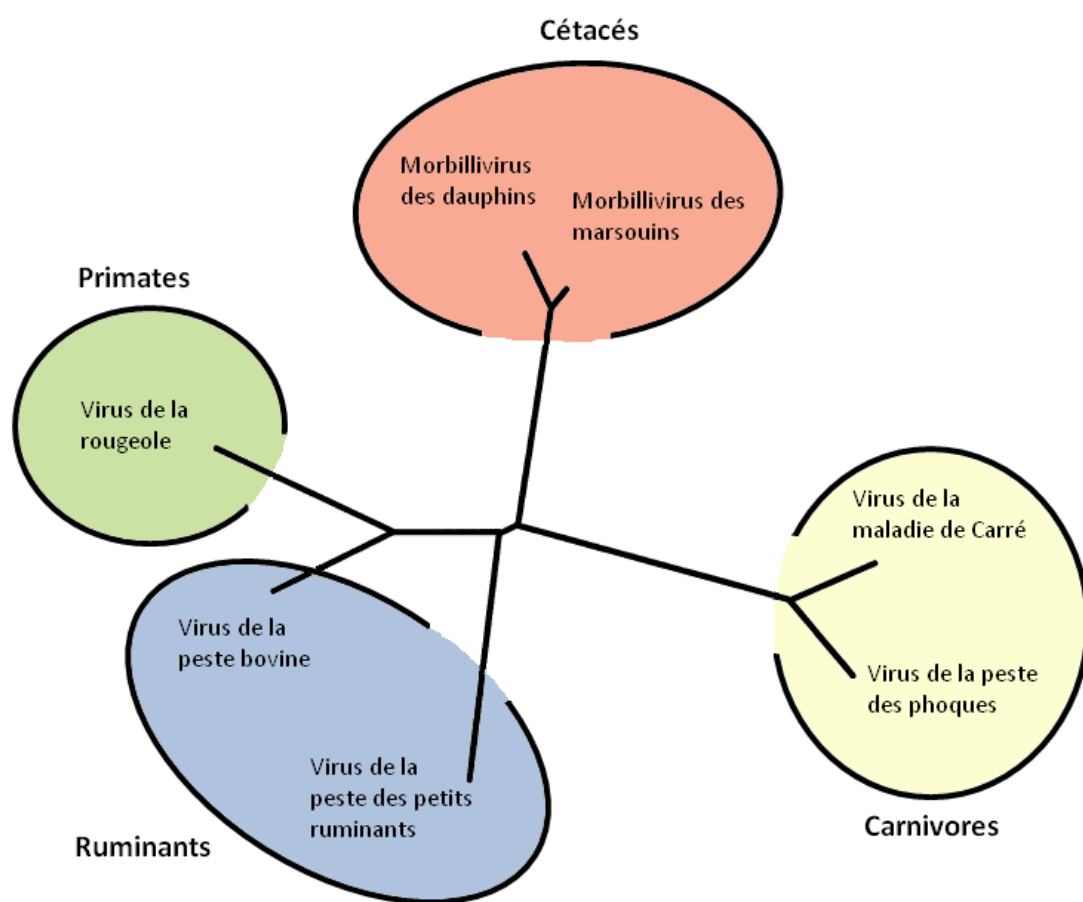
Les virus du genre *Morbillivirus* sont classés dans la famille *Paramyxoviridae*, sous-famille *Paramyxovirinae* (Gibbs et al., 1979 ; Banyard et al., 2006 ; Diallo et al., 2007). Les virus de cette famille sont antigéniquement très proches avec des réactions sérologiques croisées possibles. Ils présentent cependant une grande spécificité d'hôtes, à l'exception peut-être du virus de la maladie de Carré qui atteint généralement les canidés et les félidés sauvages, mais qui s'est probablement adapté aux mammifères marins (Osterhaus & Vedder, 1988 ; Grachev et al., 1989 ; Likhoshway et al., 1989) et les mustelidés (Appel & Gillespie, 1972). Le genre *Morbillivirus* contient des entités très pathogènes responsables de maladies graves chez l'homme et l'animal. Les principales maladies sont indiquées dans le Tableau 1.

**Tableau 1. Principaux agents pathogènes du genre *Morbillivirus* (d'après Banyard et al., 2006)**

<b>Virus</b>	<b>Maladie</b>	<b>Hôte(s)</b>
Measles virus (MV)	Rougeole	Primates (homme, singe)
Canine distemper virus (CDV)	Maladie de Carré	Canidés (et félidés sauvages, mustelidés et mammifères marins)
Rinderpest virus (RPV)	Peste bovine	Artiodactyles
Virus de la peste des petits ruminants (PPRV)	Peste des petits ruminants	Caprins, ovins et ruminants sauvages
Phocine distemper virus (PDV)	La peste des phoques	Pinnipèdes

Des études de réaction croisées avec des anticorps monoclonaux et d'analyse de séquence protéiques au sein de ce groupe viral ont permis d'établir des relations entre virus (Norrbj et al., 1985 ; Banyard et al., 2006). Cependant, les données actuelles ne permettent pas de déterminer avec certitude quel est l'ancêtre commun du genre *Morbillivirus* et de quelle espèce il provient. Le MV et le RPV sont génétiquement et antigéniquement

étroitement liés entre eux et tous les deux sont assez éloignés de CDV (Norrby et al., 1985 ; Furuse et al., 2010). PPRV pourrait être une variante de RPV qui s'est adapté aux petits ruminants et est devenu un virus distinct et éloigné de son ancêtre théorique (Gibbs et al., 1979 ). CDV et PDV sont les deux morbillivirus plus étroitement liés du point de vue génétique. Il est probable que le PDV soit issu de CDV (Barrett, 1999). Les isolats de morbillivirus de cétacés sont phylogénétiquement très proches, leur différence étant comparable à la variation intra-lignée observée chez d'autres morbillivirus (Banyard et al., 2006). Un arbre phylogénétique montrant les rapports entre les différents morbillivirus est montré dans la Figure 1.

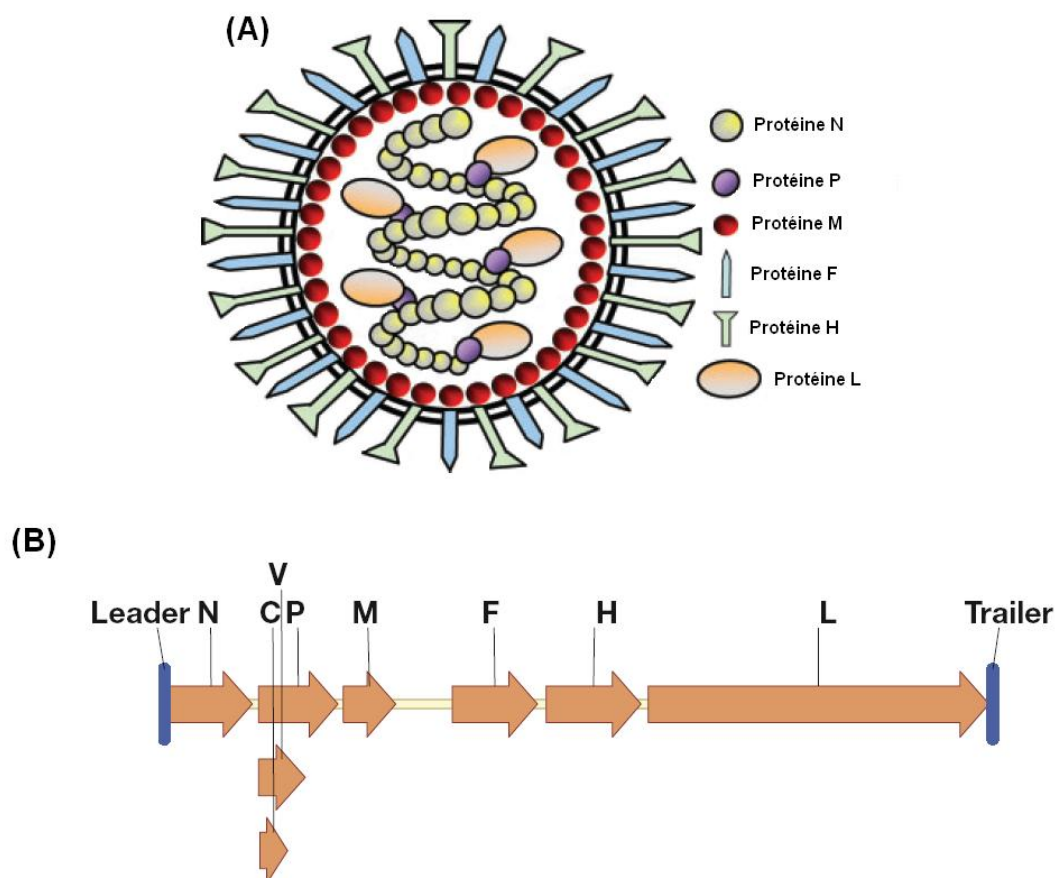


**Figure 1. Arbre phylogénétique des différents morbillivirus basé sur une séquence partielle du gène de la phosphoprotéine P (d'après Barrett, 1999, modifié).**

### 2.1.2 Structure virale et organisation génomique

Les morbillivirus sont des virus enveloppés et pléomorphes dont la taille varie de 150 à 700 nm (Pastoret et al., 1991). Leur génome est composé d'un brin d'ARN monocaténaire

négatif, non segmenté, d'environ 16 000 nucléotides (Diallo, 2003a ; Barrett et al., 2005). Leur génome respecte la « règle des six » qui s'applique à tous les virus de la sous-famille *Paramyxovirinae*. Cette règle est la conséquence de l'association de chaque sous-unité de la nucléoprotéine N à exactement six nucléotides. Selon la « règle des six », seuls les génomes dont le nombre total de nucléotides est un multiple de six sont efficacement répliqués (Halpin et al., 2004 ; Roux, 2005). En effet, la réplication de ces virus peut entraîner des erreurs : la « règle des six » laisse l'avantage aux génomes corrects (Conzelmann, 2004). Le génome est divisé en six unités transrionnelles codant pour deux protéines non structurales (protéine V et C) et six protéines structurales (protéines N, P, M, F, H et L ; Barrett, 1999 ; Baron & Barrett, 1995 ; Diallo, 1990 ; Arns et al., 2007). Le génome est ordonné comme suit 3' - N-P/C-V-M-F-H-L-5' (Figure 2B ; Barrett, 1999 ; Barrett et al., 1991 ; Diallo, 1990).



**Figure 2. Structure et organisation génomique d'un Morbillivirus.** (A) Schéma de la structure d'un Morbillivirus (d'après Banyard et al., 2010). (B) Représentation du génome d'un Morbillivirus (d'après Minet et al., 2009).

La transcription et la réplication du virus sont contrôlées par deux régions non codantes situées aux extrémités 3' et 5' du génome, le *leader* et le *trailer* (Figure 2B). Le *leader* et la partie 3' non codante de la N constituent le promoteur génomique, utilisé par la polymérase virale pour la synthèse des ARN messagers (ARNm). La partie 5' non codante de la polymérase L et le *trailer* constituent le promoteur antigénomique, utilisé par la polymérase pour la synthèse de l'ARN (+), intermédiaire de réplication du génome viral. Le *leader* et le *trailer* ont des séquences inversées complémentaires sur leurs premières bases qui constituent probablement le signal de reconnaissance de la polymérase virale.

### 2.1.3 Les protéines virales

Le génome des morbillivirus code pour six protéines structurales : N, P, M, F, H et L et deux protéines non structurales : V et C (Barrett, 1999 ; Baron et Barrett, 1995 ; Diallo, 1990 ; Arns et al., 2007).

Le Tableau 2 présente un récapitulatif de la localisation et les principales caractéristiques et fonctions de chaque protéine.

**Tableau 2. Les protéines d'un Morbillivirus (d'après Dufour, 2010).**

<i>Désignation</i>	<i>Localisation</i>	<i>Caractéristiques et Fonction(s)</i>
<i>Protéines Structurales</i>		
<i>Hémagglutinine (H)</i>	Enveloppe, face externe	Adsorption sur les cellules cibles, activité hémagglutinante
<i>Protéine de Fusion (F)</i>		Permet la fusion entre membranes virales et cellule hôte, cellule/cellule, diffusion virale sans libération dans le milieu extérieur
<i>Protéine de Matrice (M)</i>	Enveloppe, face interne	Intervient dans la morphogenèse virale
<i>Nucléoprotéine (N)</i>	Nucléocapside	Protéine majoritaire, entoure et protège l'ARN des ribonucléases
<i>Phosphoprotéine (P)</i>		Interagit avec la N pendant l'encapsidation, fait partie du complexe ARN polymérase-ARN dépendante avec la L
<i>Polymérase (L) pour Large protéine</i>		Synthèse des ARNm et réplication, constitue avec la P le complexe ARN-polymérase-ARN-dépendant
<i>Protéines Non-Structurales</i>		
(V)	Ne sont retrouvées qu'au sein des cellules infectées	Rôle dans la transcription (C) et la réplication (V) virales, mais mécanismes non connus
(C)		

#### 2.1.3.1 Les protéines structurales

Les protéines structurales ont chacune un rôle fonctionnel différent. Les protéines internes, situées dans le virion, participent à la multiplication virale et les protéines externes, qui tapissent la surface de l'enveloppe, interagissent avec les cellules de l'hôte.

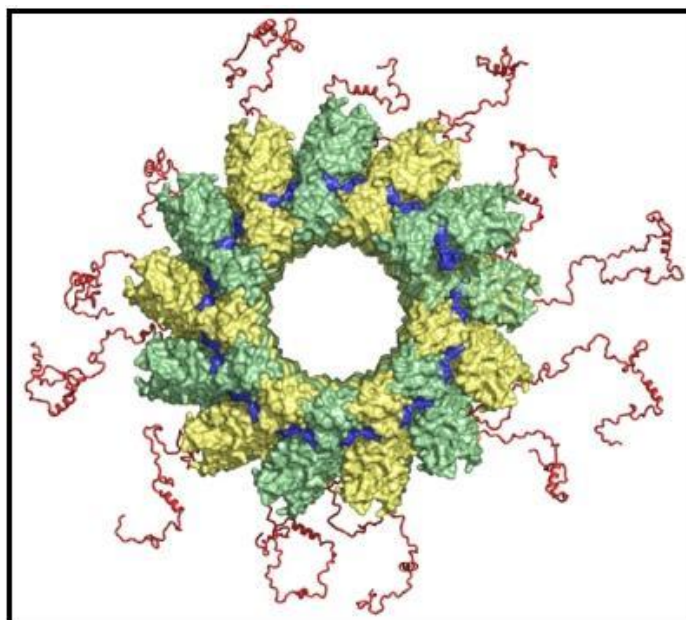
#### 2.1.3.1.1 La nucléoprotéine (N)

La protéine de la nucléocapside (N) est la protéine virale la plus abondante dans le virion et dans les cellules infectées (Diallo et al., 1987). L'ARN est enveloppé par la N pour former la nucléocapside, à laquelle sont associées deux autres protéines virales : la phosphoprotéine (P) et la polymérase (L). Ces trois protéines associées forment la ribonucléoprotéine (RNP). La RNP constitue la structure minimale essentielle pour la transcription et la réplication du génome viral dans le cytoplasme cellulaire.

La nucléoprotéine joue un rôle majeur dans l'encapsidation, la transcription et la réplication virale. La N interagit également avec le facteur de transcription IRF3, la protéine chaperonne Hsp72 et eIF3-p40 (Sato et al., 2007 ; tenOever et al., 2002 ; Zhang et al., 2005). Enfin, elle est impliquée dans certains mécanismes induisant une immunosuppression à l'échelle cellulaire. Elle est capable de se fixer aux récepteurs inhibiteurs de faible affinité pour les IgG RFcgII des lymphocytes B et d'empêcher *in vitro* la synthèse d'anticorps (Ravanel et al., 1997).

La protéine N se présente sous une forme hélicoïdale (Figure 3) avec deux grands domaines :

- Une partie N-terminal : relativement bien conservée et capable de s'homopolymériser et de se lier à l'ARN (Karlin et al., 2002).
- Une partie C-terminal : qui est hypervariable en séquence et hypersensible à la protéolyse. Elle est exposée sur la partie externe de la nucléocapside (Longhi et al., 2003 ; Longhi & Oglesbee, 2010).



**Figure 3. La nucléoprotéine virale des morbillivirus.** La partie N-terminal est colorée en vert et jaune et l'ARN viral en bleu (d'après Jensen et al., 2011).

La protéine N se lie à P via la partie N-terminal dans le complexe NP tandis que la présence de la région flexible C-terminale, à la surface de la nucléocapside, permet l'établissement d'interactions avec plusieurs partenaires viraux et cellulaires. En effet, au-delà de l'interaction avec P, la région C-terminal interagit avec la protéine de choc thermique Hsp70, ce qui entraîne une stimulation de la synthèse de l'ARN viral (Zhang et al., 2005). De plus, la liaison de C-terminal et P au sein de la ribonucléoprotéine serait le moteur permettant à la RdRp (de l'anglais *RNA-directed RNA polymerase*) de progresser le long de la nucléocapside.

La N montre une grande conservation au sein du groupe *Morbillivirus*. Cependant, cette conservation n'est pas uniforme tout au long de la protéine. En effet, il existe quatre régions avec des degrés de conservation différents. Tout d'abord la région I allant de l'acide aminé (aa) 1 à 120 est bien conservée avec un taux d'homologie variant de 75 à 83%. La région II (aa 122-145) se caractérise par une variabilité importante où la conservation n'est que de 40%. La région III (aa 146-399) est la plus conservée avec une homologie qui varie de 85-90%. Finalement, la région IV ou C-terminale (aa 400-523 ou 525) est la plus variable (Diallo et al., 1994). Ces zones sont impliquées dans différentes fonctions de la protéine. Les zones conservées sont des régions fonctionnelles essentielles au virus. Ces régions sont en effet impliquées dans l'interaction de la N avec l'ARN et l'ARN polymérase lors de la transcription et de la réplication. Elles sont également impliquées dans les interactions de la



N avec elle-même pour l'auto-assemblage autour de l'ARN génomique lors de la réplication et la formation de la nucléocapside utilisée comme matrice par la polymérase (Moyer et al., 1990 ; Bankamp et al., 1996 ; Liston et al., 1997 ; Kingston et al., 2004). Cependant, les régions variables ont également des fonctions importantes, comme la région IV qui est responsable de l'interaction avec la protéine P et avec le complexe polymérase P-L (Bankamp et al., 1996 ; Longhi et al., 2003 ; Bourhis et al., 2004). Cette même région interagit aussi avec la protéine M lors du bourgeonnement qui suit l'assemblage des éléments de la RNP (Haffar et al., 1999 ; Coronel et al., 2001). Cette région intervient également dans les régulations cellulaires du facteur trois de l'interféron (Banyard et al., 2008) et également dans la régulation du récepteur cellulaire de la nucléoprotéine (tenOever et al., 2002 ; Zhang et al., 2002 ; Laine et al., 2003).

#### 2.1.3.1.2 La phosphoprotéine (P)

La phosphoprotéine joue un rôle central dans la transcription et la réplication au même titre que la nucléoprotéine et constitue l'une des trois protéines de la RNP. Deux fonctions distinctes sont attribuées à la protéine P lors de la réplication virale (Harty & Palese, 1995 ; Nishio et al., 1996 ; Shaji & Shaila, 1999 ; Lamb & Kolakofsky, 2001) :

- Elle sert de cofacteur de la polymérase et permet sa fixation sur la nucléocapside ;
- Elle possède la capacité de se lier à la nucléoprotéine libre pour empêcher ainsi l'auto-assemblage non spécifique de cette dernière sur les ARN cellulaires.

La protéine P contient deux domaines structurellement et fonctionnellement distincts. La moitié N-terminale est peu conservée (Karlin et al., 2002) et impliquée dans la réplication (Curran et al., 1994 ; Curran et al., 1995 ; Curran, 1996). La partie C-terminale, quant à elle, est bien conservée et contient toutes les régions nécessaires à la transcription (Curran, 1996).

#### 2.1.3.1.3 La polymérase (L)

La polymérase est la troisième protéine qui forme la RNP avec la N et la P. Cette protéine moins abondante que les deux premières est relativement bien conservée chez les *Paramyxoviridae*. Elle a un rôle dans la fixation de l'ARN viral, ainsi qu'une activité polymérasique (initiation, élongation, terminaison, coiffage, méthylation et polyadénylation ; Schnell & Conzelmann, 1995). La L a également des activités enzymatiques kinasique et ATPasique (Bailey et al., 2005). Lors de sa libération, le virus emprunte son enveloppe à celle de la cellule hôte dans laquelle s'insèrent trois autres protéines virales : M, F et H.

#### 2.1.3.1.4 La protéine de matrice (M)

La protéine M est la plus conservée dans la famille *Paramyxoviridae*. Cette forte conservation peut probablement être expliquée par le rôle crucial que joue la protéine dans la morphologie du virion des paramyxovirus. La protéine M permet les interactions entre les queues cytoplasmiques des protéines F et H et la nucléoprotéine, ainsi que la RNP (Peeples, 1991 ; Haffar et al., 1999). Elle joue également un rôle primordial dans l'incorporation de la nucléocapside dans le virion après avoir initié le bourgeonnement de la membrane cellulaire (Haffar et al., 1999 ; Runkler et al., 2007).

#### 2.1.3.1.5 L'héماغglutinine (H)

La protéine H est une protéine virale transmembranaire qui est responsable de l'attachement des morbillivirus aux récepteurs membranaires cellulaires (Choppin & Scheid, 1980 ; Lamb & Kolakofsky, 2001). En association avec la protéine de fusion, la H forme l'enveloppe protéique virale. Structuellement, elle est divisée en deux régions. La première, la région N-terminale, sert à l'ancrage transmembranaire et possède la fonction de signal peptidique participant aux échanges cytoplasmiques. La seconde, la région C-terminale, est hypervariable et exposée à la surface de l'enveloppe virale. En raison de sa position, la H est très importante dans l'induction de la protection immune et la plupart des anticorps

neutralisants sont dirigés contre elle. Elle présente également des propriétés neuraminidasiques et comme son nom l'indique, des capacités hémagglutinantes.

#### 2.1.3.1.6 La protéine de fusion (F)

La protéine F est responsable de la fusion de la membrane virale avec celle de la cellule hôte qui permettra la libération des nucléocapsides dans le cytoplasme cellulaire où aura lieu la multiplication virale. La coopération de la protéine H est nécessaire lors de ce processus (Plempner et al., 2002 ; Wild et al., 1991). La protéine est très conservée en dehors de deux régions variables situées au niveau des deux extrémités (Meyer & Diallo, 1995).

#### 2.1.3.2 Les protéines non structurales

Le génome viral code également deux protéines non structurales C et V. Leur synthèse est dirigée par le gène de la protéine P. Au cours de la multiplication virale, le gène correspondant à cette protéine est transcrit en deux ARNm. Le premier est traduit en P (507 aa) à partir du premier codon d'initiation AUG. Cependant, il existe un deuxième codon AUG en aval du premier, en position 23 sur l'ARN, et qui se trouve dans des conditions favorables pour jouer une fonction de codon d'initiation. Il permet la synthèse d'une deuxième protéine, la protéine C (177 aa), plus petite que P. Le second ARNm du gène P n'est pas une copie exacte du gène car il comporte une base G supplémentaire insérée dans l'ARN au cours de sa synthèse par un mécanisme de bégaiement de la polymérase connu sous le terme « *editing* ». L'addition de cette base supplémentaire est faite à un point précis de l'ARNm, en position 693. La conséquence de cette insertion est le changement du cadre de lecture de l'ARNm à partir de cette position, générant un nouveau codon stop à la position 894 : ce processus entraîne la synthèse d'une protéine plus courte, la protéine V (298 aa ; Minet et al., 2009).

Les protéines C et V interfèrent avec l'immunité innée en bloquant la réponse interféron par les cellules hôtes (Gotoh et al., 2001 ; Boxer et al., 2009) et seraient également liées à la prévention de l'apoptose (Takeuchi et al., 2005 ; Cruz et al., 2006).

#### 2.1.3.2.1 La protéine C

La protéine C est une petite protéine de forte charge positive, codée par l'ARNm de P (Bellini et al., 1985 ; Liston & Briedis, 1995). Elle serait impliquée dans le contrôle de la réponse innée de l'hôte par le blocage de la synthèse des interleukines et par la répression de la réponse IFN (Shaffer et al., 2003 ; Yokota et al., 2003). Elle serait également capable de réguler les activités de l'ARN polymérase ARN-dépendante RdRp (Reutter et al., 2001). Cependant, des virus recombinants, dépourvus de C se répliquent convenablement *in vitro* dans certains types cellulaires (Radecke & Billeter, 1996 ; Escoffier et al., 1999 ; Patterson et al., 2000 ; Shaffer et al., 2003 ; Takeuchi et al., 2005). *In vivo*, par contre, les virus C- sont moins pathogènes suite, vraisemblablement, à une moindre croissance (Valsamakis et al., 1998 ; Patterson et al., 2000 ; Takeuchi et al., 2005). La protéine C aurait également un rôle dans la transcription.

#### 2.1.3.2.2 La protéine V

La protéine V serait impliquée dans le contrôle de la mise en place de la réponse interféron. La principale fonction de cette protéine serait de bloquer la réponse immunitaire innée de l'hôte et ainsi permettre la propagation du virus. Elle se lie à l'hélicase MDA-5, une protéine activant la production d'interféron  $\beta$ , et l'inhibe. Elle interagit également avec des protéines présentes dans la signalisation, induites par le récepteur d'interférons de type 1. Elle bloque donc les voies de signalisation cellulaire en lien avec les interférons. Malgré cela, des études ont montré qu'elle n'était pas requise pour la propagation du virus *in vitro* (Kato et al., 1997 ; Schneider et al., 1997 ; Delenda et al., 1998 ; Skiadopoulos et al., 1999 ; Baron & Barrett, 2000). Son absence limiterait la pathogénicité du virus *in vivo* (Tober et al., 1998 ; Valsamakis et al., 1998 ; Patterson et al., 2000). Le fait que V puisse inhiber la réplication a été avancé pour expliquer ces résultats (Witko et al., 2006), d'autant que des virus recombinants, déficients pour la protéine V, produisent des niveaux d'ARN génomique, d'ARNm et de protéines virales supérieurs à la normale au cours de l'infection *in vitro* (Tober et al., 1998 ; Baron & Barrett, 2000). Le mécanisme par lequel V agit sur l'expression génique et la réplication n'est pas connu. Cependant, le fait que la protéine V puisse se lier aux protéines virales N et L, mais également à l'ARN, suggère que ces

interactions soient importantes (Curran & Kolakofsky, 1991 ; Horikami et al., 1996 ; Sweetman et al., 2001 ; Parks et al., 2006).

#### 2.1.4 Réplication virale

La réplication des morbillivirus se fait comme celle de tous les virus à génome ARN négatif et le mécanisme de multiplication s'appuie sur le modèle du virus de la rougeole. Le cycle de réplication débute par la fixation des spicules de la glycoprotéine virale H sur les récepteurs mucoprotéiques des cellules (Diallo, 2003b). Deux protéines cellulaires ont été identifiées comme récepteurs permettant la fixation du virus de la rougeole. Le premier appartient aux molécules du SLAM (Signalling Lymphocyte Activation Molecule), plus précisément le récepteur CD150 qui est exprimé à la surface des lymphocytes, des monocytes, des macrophages et des cellules dendritiques matures (Tatsuo & Yanagi, 2002). Le second est le récepteur CD46, identifié comme récepteur des souches vaccinales du virus de la rougeole, adaptée à la culture cellulaire (Manchester et al., 2000 ; Erlenhofer et al., 2002).

Une fois le virus lié à la cellule par le pont H-CD150, la glycoprotéine virale F assure l'induction de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. Après libération de la nucléocapside virale dans le cytoplasme de la cellule hôte, la transcription du génome viral est initiée. La polymérase ARN dépendante de l'ARN s'accroche au promoteur génomique de l'extrémité 3' du génome viral et entame la synthèse d'ARN. L'enzyme progresse de façon séquentielle et synthétise individuellement chacun des ARN messagers. Ce mode de transcription aboutit à la synthèse d'ARNm monocistroniques traduits en protéines par la cellule hôte. Un gradient de transcrit s'établit, les ARNm les plus proches de la séquence *leader* étant les plus abondants. Ce gradient a pour conséquence de contrôler la synthèse protéique virale.

Au cours du cycle viral, la transcription laisse progressivement place à la réplication qui consiste en la synthèse complète de génomes viraux. La polymérase ayant servi à la transcription, génère une copie complète de polarité positive du brin complémentaire, appelée antigénome, en ignorant cette fois-ci les signaux de jonction entre les gènes. Cet antigénome est ensuite répliqué pour produire un génome de polarité négative. Cette phase de réplication dépend étroitement de l'interaction de la P avec la N. Ces protéines néoformées vont se lier à l'ARN en cours de la synthèse effectuée par la polymérase et

former de nouvelles ribonucléoprotéines virales. Celles-ci, grâce à l'affinité des protéines N et M, vont migrer vers la membrane cellulaire où sont insérées les glycoprotéines virales F et H. L'interaction entre les glycoprotéines d'enveloppe et les RNP permet la formation de bourgeons qui vont se détacher de la cellule cible et donner naissance à un virion complet dans le milieu extérieur (Diallo, 2003a). La multiplication du virus entraîne la mort et la lyse de la cellule. La Figure 4 récapitule tout le processus de réplication des morbillivirus.

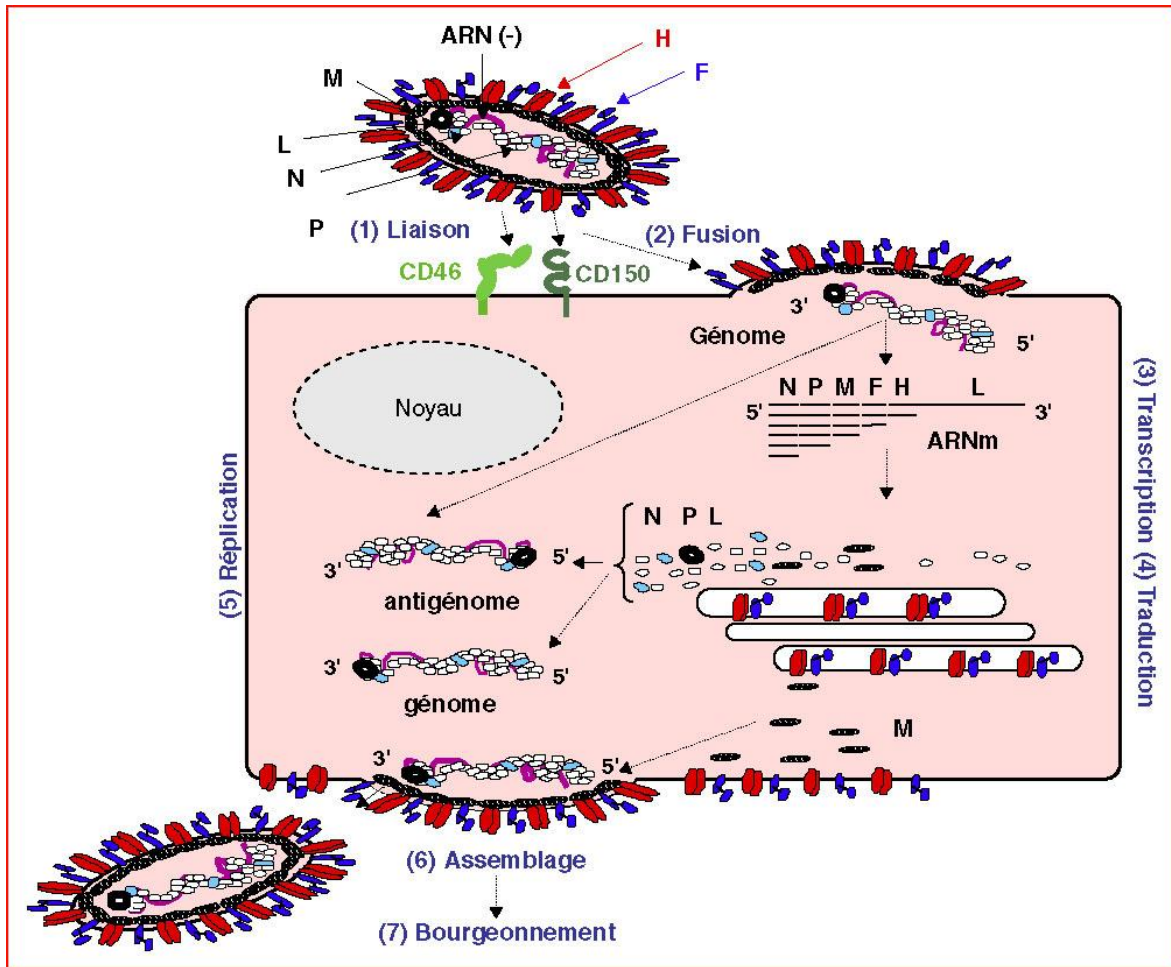


Figure 4. Cycle de l'infection par les morbillivirus (d'après Gerlier et al., 2007).

#### 2.1.5 Propriétés physico-chimiques

Les morbillivirus sont des virus sensibles à la chaleur et aux rayonnements ultraviolets (Lefèvre, 2003 ; Diallo, 2003a). Ils sont détruits en moins de trois heures après exposition à 56°C, en deux jours après exposition à 37°C et une dizaine de jours à 4°C. Cependant, ces virus peuvent être conservés sur plusieurs décennies à -80°C (Rossiter & Taylor, 1994 ; Lefèvre, 2003 ; Diallo, 2003a) et la lyophilisation permet de les stabiliser.

(Worrwall et al., 2001). Les morbillivirus sont également inactivés par certains produits chimiques tels que les solvants lipidiques à base d'éther, de chloroforme et d'alcool et les désinfectants classiques comme le phénol, le formol, la soude, les ammoniums quaternaires et le glycerol (Rossiter & Taylor, 1994 ; Lefèvre, 2003 ; Diallo, 2003a).

## 2.1.6 Morbillivirus des humains

### 2.1.6.1 Virus de la rougeole (*measles virus* - MV)

Le MV est responsable de la rougeole, maladie très contagieuse pour l'homme, bénigne le plus souvent sous nos climats, mais cause majeure de mortalité infantile dans les pays en voie de développement (Katz, 1995). Les taux de mortalité les plus élevés concernent les enfants de moins de cinq ans, atteignant jusqu'à 20% chez les nourrissons de moins d'un an (de Quadros et al., 2003). Les premiers symptômes de la maladie apparaissent généralement de huit à douze jours après l'exposition (Stadlmann et al., 2011) et comprennent une forte fièvre, écoulement nasaux, toux, conjonctivite et de minuscules tâches blanches, appelées tâches de Koplik, dans la bouche (Ludlow et al., 2009 ; Furuse et al., 2010). Une éruption cutanée sous forme de tâches rouges apparaît au visage, puis s'étend au reste du corps (Figure 5). La rougeole peut causer des otites, l'appendicite ou une pneumonie (Stadlmann et al., 2011). La plupart des personnes atteintes sont malades jusqu'à dix jours puis se rétablissent complètement et acquièrent une immunité à vie (Black & Rosen, 1962 ; Nanan et al., 2000). Cependant de rares cas, et notamment chez les enfants, la maladie peut évoluer vers des complications neurologiques sévères, avec invalidités définitives, convulsions, surdité, cécité, voire mortalité (Morgan & Rapp, 1977). La mortalité résulte le plus souvent de complications secondaires liées à la pneumonie, la diarrhée et la malnutrition.



**Figure 5. Symptôme classique de la rougeole : éruption cutanée sous forme de tâches rouges.**

Le virus de la rougeole, extrêmement contagieux, se propage lorsque les malades toussent ou éternuent, par contact rapproché entre personnes ou par contact direct avec des sécrétions nasales ou laryngées (Ludlow et al., 2009 ; Plemper & Snyder, 2009). Le virus reste actif et contagieux dans l'air ou sur les surfaces contaminées pendant des heures (Sabella, 2010). L'infection débute principalement par la fixation du virus aux cellules épithéliales respiratoires où le virus se répliquera localement avant de se propager dans l'organisme (de Swart, 2008). Une première virémie survient avec une dissémination du



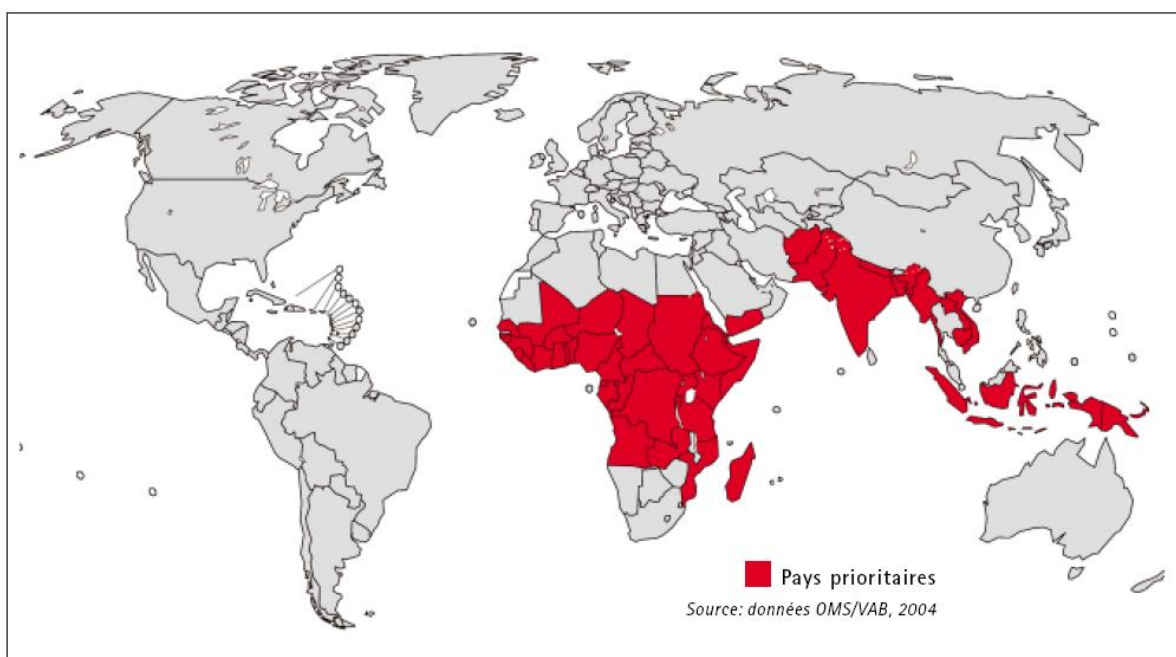
virus vers les tissus lymphatiques, suivie d'une deuxième virémie et la propagation du virus à d'autres tissus à travers les monocytes et les lymphocytes infectés (de Swart, 2008 ; Sabella, 2010 ; Stadlmann et al., 2011). Les porteurs peuvent transmettre le virus pendant les quatre jours qui précèdent l'apparition des symptômes et jusqu'à quatre jours après leur rétablissement (Sabella, 2010).

Même si les symptômes de la rougeole sont très évocateurs, compte tenu de la baisse de l'incidence de la maladie, il est fortement recommandé que le diagnostic soit confirmé biologiquement. La rougeole peut être confondue avec d'autres maladies fébriles telles que la rubéole, la dengue, les infections par les parvovirus, l'érythème multiforme, le syndrome de Stevens-Johnson et la fièvre à streptocoque (Sabella, 2010). Les procédures pour l'identification de l'agent sont basées sur des méthodes classiques de diagnostic de laboratoire comme l'isolement viral, l'immunofluorescence, l'immunopéroxydase, l'ELISA ou la PCR.

Bien qu'il n'y ait pas de traitement pour la rougeole, une prise en charge appropriée permet d'éviter les complications graves. Le malade doit être bien nourri et avoir un apport hydrique suffisant. Les antibiotiques sont recommandés pour traiter les infections oculaires et auriculaires ainsi que la pneumonie. Il convient d'administrer aussi du complément vitaminique A qui pourra contribuer à éviter les lésions oculaires et la cécité. De plus, il a été établi que l'administration de vitamine A permettait de réduire la morbidité et la mortalité (Barclay et al., 1987 ; Sudfeld et al., 2010). Il existe un vaccin sûr et efficace disponible depuis les années 60 (Hilleman et al., 1962 ; 1968). Il doit être administré en deux doses pour assurer une protection complète. Cependant, ce vaccin n'est pas obligatoire, mais seulement fortement recommandé. Néanmoins, la vaccination constitue un acte de solidarité dans la lutte pour l'éradication de cette maladie susceptible de provoquer de graves séquelles chez certains enfants. Toutefois, la rougeole reste, au niveau mondial, la principale cause de mortalité due à des maladies pourtant évitables par la vaccination (de Quadros et al., 2003). Les inégalités d'accès aux vaccins à l'intérieur même des pays font que les décès et les invalidités dus à la rougeole affectent essentiellement les populations les plus pauvres, les plus marginalisées et les plus isolées. L'incapacité de distribuer au moins une dose de vaccin antirougeoleux à tous les nourrissons reste la raison principale du taux de mortalité élevé (d'après les données de l'Organisation Mondiale de la Santé, OMS).

L'OMS, l'UNICEF (The United Nations Children's Fund) et leurs partenaires ont lancé un plan mondial pour la réduction de la mortalité due à la rougeole, qui a été adopté par l'Assemblée mondiale de la Santé en 2003. Cette stratégie avait pour objectif de : donner

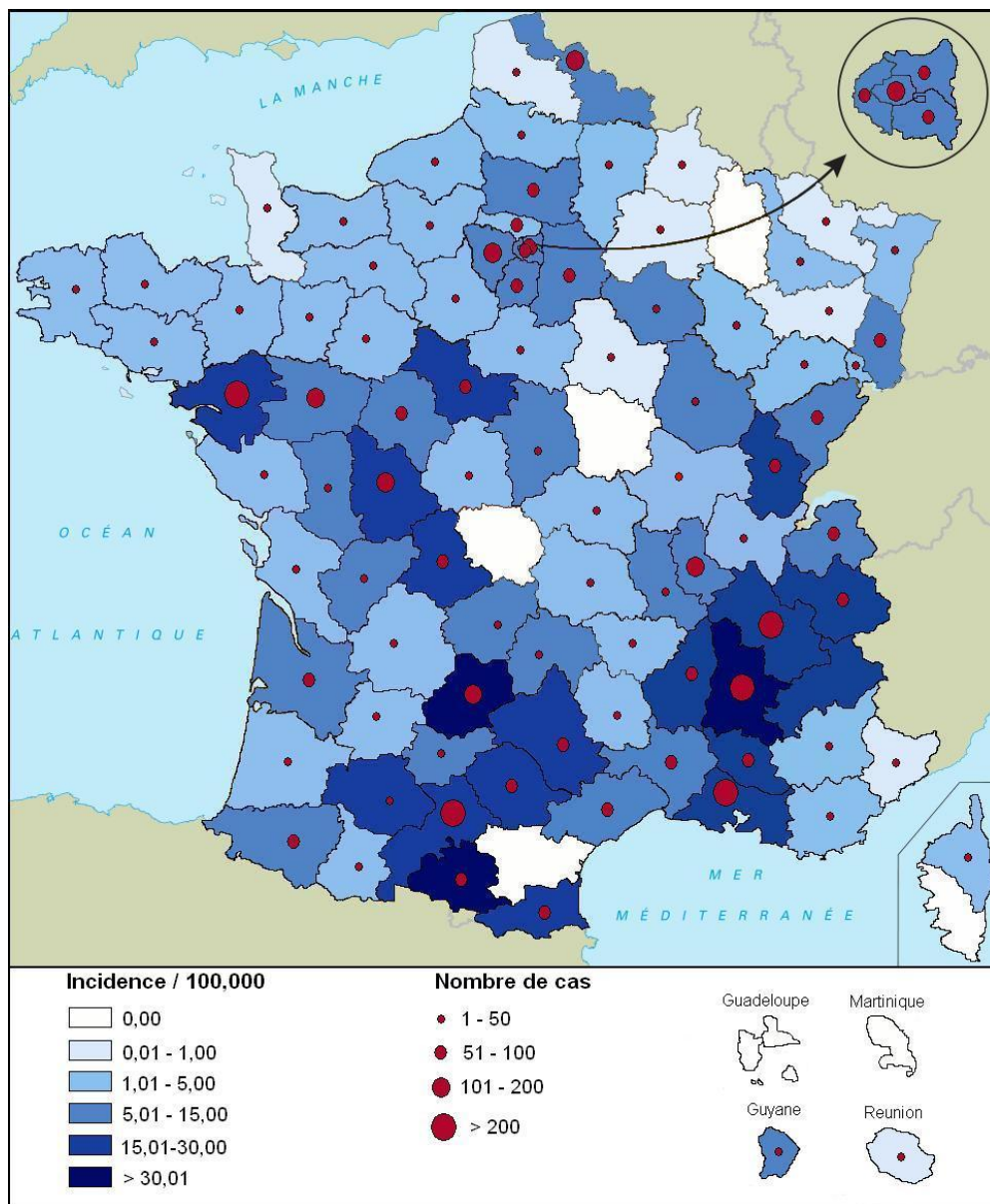
une dose de vaccin antirougeoleux à chaque enfant avant l'âge de 12 mois ; donner une seconde opportunité de vaccination antirougeoleuse à chaque enfant entre neuf mois et 15 ans ; assurer une surveillance efficace et améliorer la prise en charge clinique des cas avec complication. Ce plan ciblait 47 pays prioritaires (Figure 6) qui totalisaient environ 98% des décès dus à la rougeole dans le monde (Estimation OMS pour 2004). Grâce à cette stratégie, la rougeole a déjà été éliminée de la Région OMS des Amériques (de Quadros et al., 2003) et trois autres régions ont également atteint les objectifs régionaux (Europe, Pacifique occidental et Méditerranée orientale). Les pays prioritaires sont aussi en bonne voie et une réduction de 90% des décès (par rapport à l'année 2000) était attendue pour l'année 2010 (d'après les données de l'OMS).



**Figure 6. Carte des 47 pays prioritaires pour la réduction de la mortalité due à la rougeole (d'après les données de l'OMS).**

La rougeole est devenue en juin 2005 une maladie à déclaration obligatoire. Même si on peut constater une réduction de la morbidité et de la mortalité due à cette maladie dans le monde, des cas de résurgence ont été rapportés et son endémicité a été établie dans plusieurs pays dit industrialisés, comme les USA, le Canada, le Royaume-Uni et la France (Plempner & Snyder, 2009). Les principales causes pouvant expliquer cette recrudescence sont l'insuffisance de la couverture vaccinale et la méconnaissance par certains cliniciens et biologistes du signalement obligatoire et sans délai de cas suspectés ou confirmés biologiquement.

Les pays de la Région européenne de l'OMS continuent de lutter contre d'importantes flambées épidémiques de rougeole qui ne cessent de se propager d'un pays à l'autre et à d'autres régions du monde. L'Allemagne, le Danemark, l'ex-République yougoslave de Macédoine, la Norvège, les Pays-Bas, la Serbie et la Suisse ont observé des cas de rougeole en 2011. La Turquie a récemment signalé une flambée épidémique à Istanbul, en plus de cas liés à une flambée importante de rougeole survenue en 2010 en Bulgarie. En outre, de petites flambées épidémiques ont eu lieu en Fédération de Russie (Krasnoïarsk et Tomsk), associées à des cas observés en Ouzbékistan. En France, la rougeole sévit depuis début 2008. La circulation du virus s'est intensifiée en début d'année 2010 (Parent du Châtelet et al., 2010) et depuis, la circulation du virus a touché l'ensemble du territoire métropolitain (Figure 7). Plus de 5 000 cas y ont été signalés en 2010, et les données préliminaires de 2011 indiquent que cette tendance se poursuit, avec près de 1 000 cas rien qu'en janvier (selon les données de l'OMS). La mise à jour sans délai de la vaccination anti-rougeoleuse dès l'âge de 12 mois (neuf mois si en collectivités) et pour les personnes nées depuis 1980 non vaccinées selon les recommandations du calendrier vaccinal est le seul moyen de stopper la diffusion actuelle du virus en France (données de l'InVS, Institut de Veille Sanitaire).



**Figure 7. Nombre de cas de rougeole survenus en France et taux d'incidence par départements en 2010 (d'après l'InVS).**

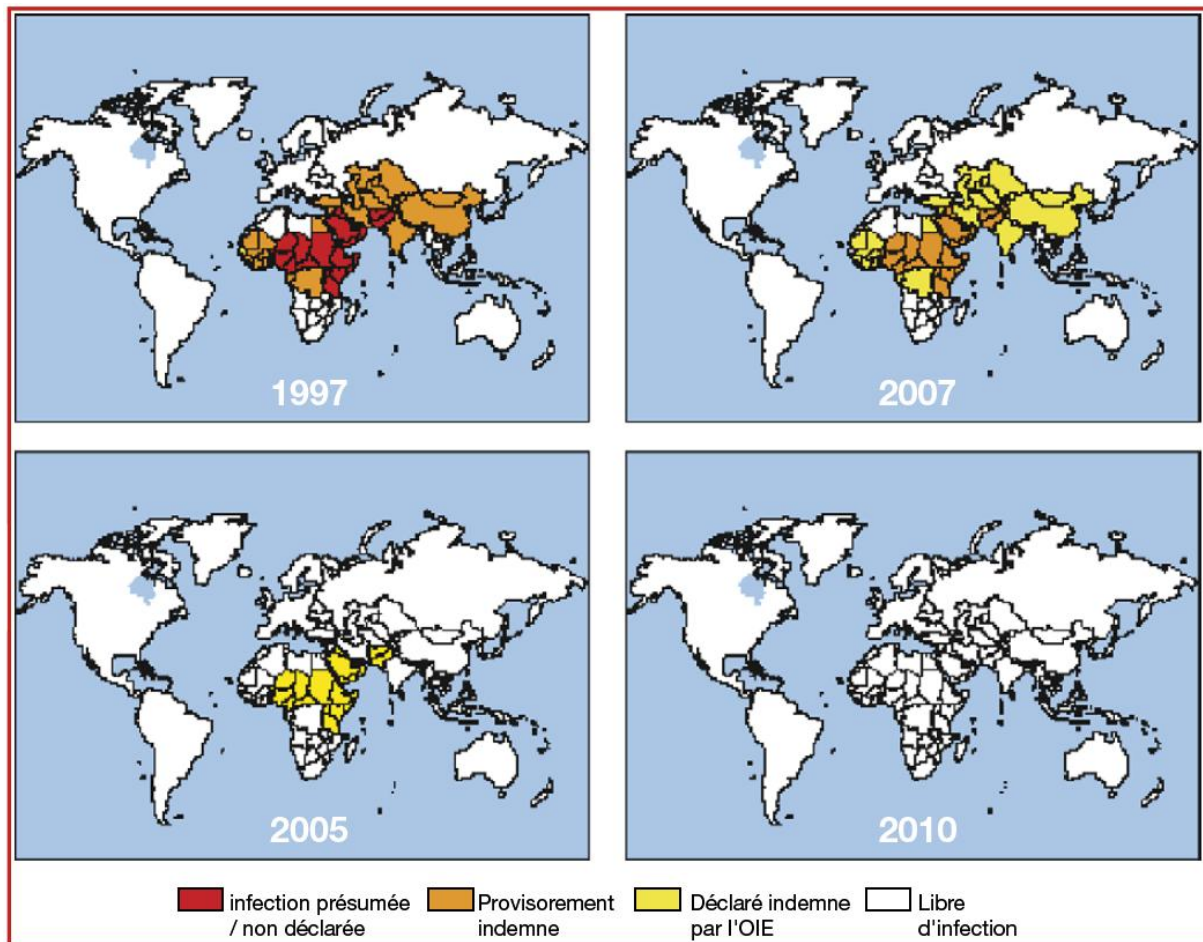
## 2.1.7 Morbillivirus des ruminants

### 2.1.7.1 Virus de la peste bovine (PBV) ou rinderpest virus (RPV)

La peste bovine (PB) est une maladie hautement contagieuse due au virus de la peste bovine, aussi connue comme rinderpest virus. Elle a été considérée pendant des siècles comme la plus importante des maladies des ruminants en raison de la très forte mortalité qu'elle pouvait entraîner. Les documents les plus anciens y faisant référence remontent au

troisième millénaire avant notre ère. Mais ce n'est qu'à partir du XVIII<sup>e</sup> siècle que les connaissances sur la peste bovine se précisent (Lefèvre, 2003). Aux XVIII<sup>e</sup>, XIX<sup>e</sup> et XX<sup>e</sup> siècles, elle a été responsable des graves épidémies en Europe et en Afrique subsaharienne (Arns et al., 2007). La maladie a décimé les cheptels, tuant jusqu'à 100% des bovins ou des buffles infectés, ce qui a entraîné de nombreuses famines. Des centaines de millions de têtes de bétail ont succombé au virus de la peste bovine lors d'épidémies en Asie, en Europe et en Afrique. Ce n'est qu'à la fin du XX<sup>e</sup> siècle que la peste bovine voit son aire de répartition se réduire (Lefèvre, 2003). En 1957, la découverte d'un vaccin efficace a permis d'amorcer le contrôle de la maladie (Plowright & Taylor, 1967).

L'éradication de la peste bovine était depuis fort longtemps au cœur des priorités de la FAO (Food and Agriculture Organization) et de l'Union Européenne. Le programme mondial d'éradication de la peste bovine (GREP), l'un des éléments clés du système de prévention et de réponse rapide contre les ravageurs et les maladies transfrontières des animaux et des plantes (EMPRES), est né en 1994 en tant que mécanisme de coordination internationale pour la promotion de l'éradication de la peste bovine et la vérification de sa disparition, tout en formulant des recommandations techniques pour atteindre cet objectif. Le 25 mai 2011, l'OIE (Organisation mondiale de la santé animale) déclare la peste bovine éradiquée de la surface de la Terre (Figure 8). Ainsi doivent-elle la première maladie animale à avoir été éradiquée par l'homme. Jusqu'à présent, une seule maladie humaine a été éradiquée : il s'agit de la variole, en 1980.

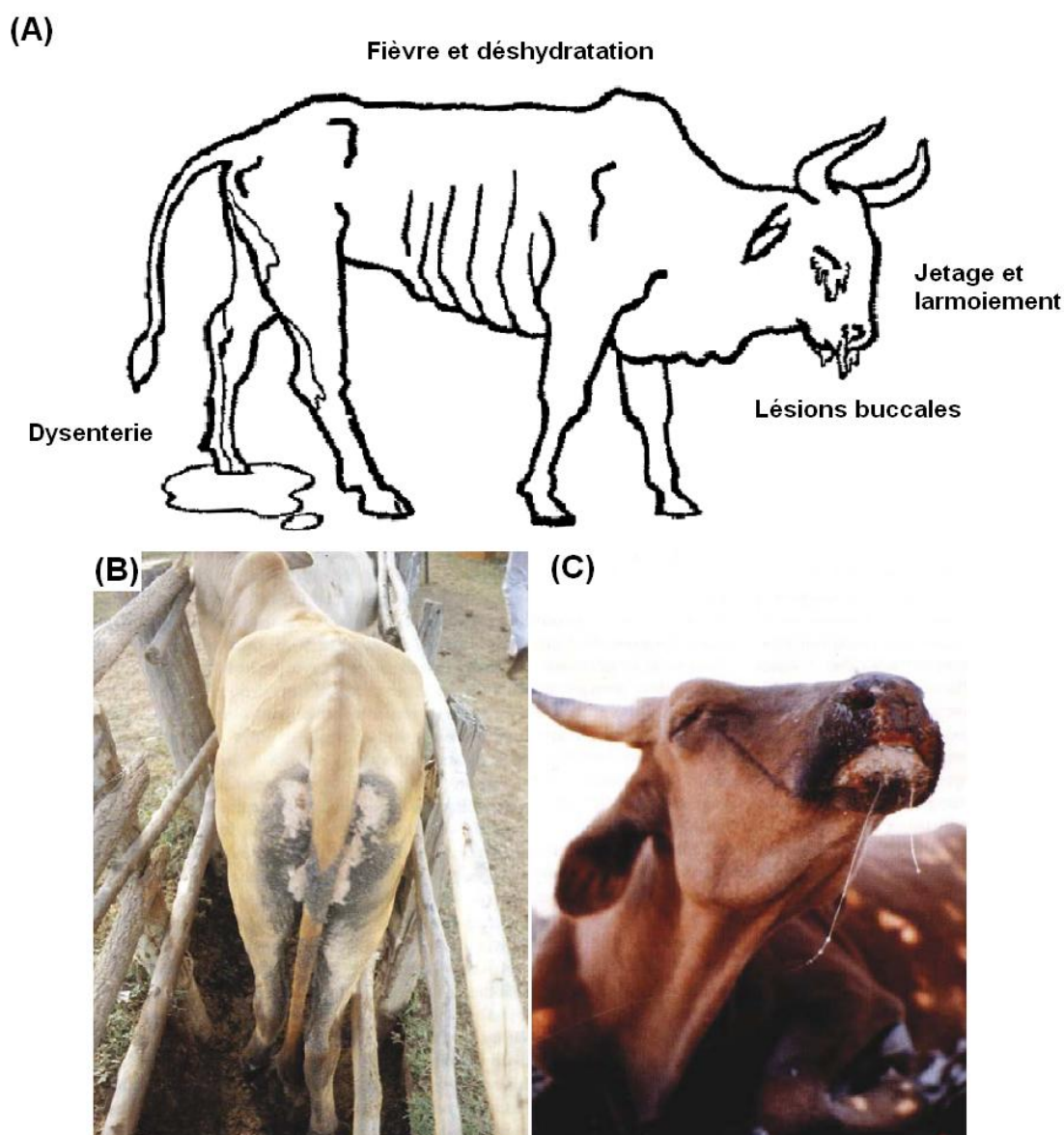


**Figure 8. Evolution de la répartition géographique de la peste bovine.** L'objectif de l'éradication a été atteint en 2010, (d'après les données de la FAO - Food and Agriculture Organization).

La peste bovine affecte de nombreuses espèces d'animaux sauvages et domestiques artiodactyles, y compris ovins et caprins. Le plus souvent, elle atteint les bovins et les buffles sensibles. L'infection par le virus de la peste bovine est à l'origine d'une maladie qui génère des taux de morbidité et de mortalité pouvant atteindre 100% (Arns et al., 2007). La durée d'incubation est de quatre à sept jours en moyenne (Liess & Plowright, 1964) et l'excrétion du virus par les animaux infectés est précoce (un ou deux jours avant l'apparition des symptômes). La transmission du virus bovipestique se fait surtout par contact direct entre animaux. Le virus peut être retrouvé dans les larmes, le mucus nasal, la salive, mais aussi, à un moindre degré, dans l'urine et les excréments (Lefèvre, 2003). La maladie peut apparaître sous plusieurs formes : aiguë, suraiguë, atypique (forme nerveuse ou forme cutanée), subaiguë et fruste (Lefèvre, 2003). La forme aiguë est la plus classique. Les animaux atteints évoluent soit vers la guérison, avec une protection solide et durable, soit vers la mort. Les portes d'entrée principales du virus sont les muqueuses respiratoire et

digestive. Le virus possède un lymphotropisme primaire suivi d'un tropisme épithélial (Lefèvre, 2003). Les signes de la maladie sont la fièvre, les érosions buccales, le jetage nasal et oculaire, les diarrhées profuses et la déshydratation qui précèdent souvent une issue fatale dans les six à douze jours qui suivent l'apparition des symptômes (Figure 9). Sur le plan anatomopathologique, elle est caractérisée par une gastroentérite hémorragique (Lefèvre, 2003). Les symptômes de la peste bovine ne sont pas pathognomoniques et ils peuvent être confondus avec ceux de la peste des petits ruminants, bien que l'atteinte pulmonaire soit de règle chez cette dernière. En fait, seul le diagnostic expérimental peut distinguer les deux maladies (Lefèvre, 2003). La peste bovine peut être également confondue avec la diarrhée à virus des bovins (BVD). Toutefois, son impact, à l'échelle d'un troupeau dépasse celui de la BVD (Lefèvre, 2003). Le diagnostic de laboratoire peut-être réalisé à partir des larmes, de l'urine, du sang, des sécrétions nasales et orales et des fèces collectés d'animaux malades, ainsi que des prélèvements des ganglions lymphatiques et de la rate d'animaux morts ou sacrifiés (Arns et al., 2007). Les épreuves sérologiques mettent en évidence une exposition au virus, tandis que le diagnostic définitif repose sur l'identification du virus à partir du sang ou des tissus. Le diagnostic de laboratoire est d'autant plus important car l'infection par le virus bovipestique peut aussi passer inaperçu (Anderson et al., 2006). L'animal infecté est cependant dangereux sur le plan épidémiologique car il contribue à la diffusion du virus.





**Figure 9. Symptômes de la peste bovine.** (A) Schéma d'un animal malade présentant les symptômes caractéristiques de la peste bovine (Lefèvre, 2003), (B) et (C) Signes cliniques des animaux atteints de la peste bovine, diarrhée et jetage, respectivement (Minet et al., 2009).

Il n'y a aucun traitement spécifique contre la peste bovine. Pour le contrôle de la maladie, des mesures classiques de restriction de l'importation doivent être prises. En cas de foyers, la solution la plus rapide et efficace reste l'abattage et la destruction des cadavres. Lorsque l'infection est largement diffusée, seule une stratégie de vaccination massive peut être envisagée. Un vaccin à virus atténué par passages successifs en culture cellulaire (Plowright & Taylor, 1967) a été un des éléments du succès de la campagne mondiale d'éradication de la peste bovine. En effet, ce vaccin confère, pratiquement à vie, une très bonne immunité (Plowright & Taylor, 1967 ; Plowright, 1984).



### 2.1.7.2 Virus de la peste des petits ruminants (PPRV)

#### 2.1.7.2.1 Description de la maladie

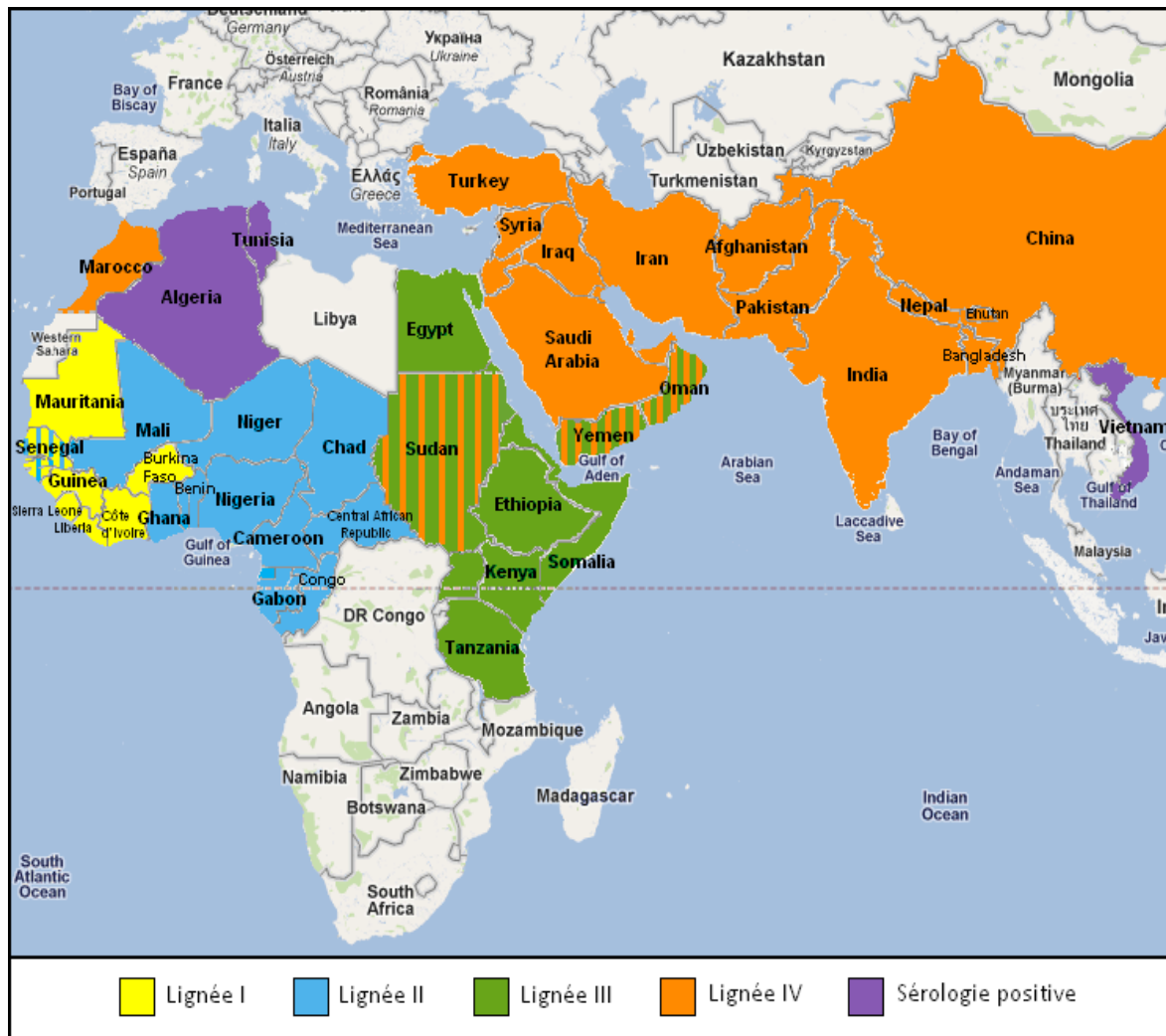
Le virus de la peste des petits ruminants est responsable d'une maladie infectieuse et contagieuse des petits ruminants domestiques et sauvages (la peste des petits ruminants, PPR ; Gibbs et al., 1979 ; Furley et al., 1987). Dans les pays en voie de développement, notamment d'Afrique, d'Asie et du Moyen Orient, cette maladie est largement répandue. En raison des pertes économiques qu'elle entraîne, elle constitue un frein considérable au développement de l'élevage des petits ruminants et menace le patrimoine des petits éleveurs. Ainsi, son contrôle est un objectif important pour la réduction de la pauvreté dans ces pays (Perry et al., 2002).

La PPR est une maladie relativement récente qui a été longtemps considérée comme de la peste bovine affectant les petits ruminants. Elle a seulement été reconnue comme entité pathologique distincte en 1942 en Côte d'Ivoire (Gargadennec et Lalanne, 1942). Au début, elle a été nommée « Kata », ou « complexe stomato-pneumo-entéritique », ou « pseudorinderpest », ainsi que « peste des espèces ovine et caprine » (Otte, 1960 ; Rowland et al., 1969 ; Rowland & Bourdin, 1970 ; Hamdy et al., 1976). Le premier isolement du virus a été réalisé au Sénégal en 1962 (Gilbert & Monnier, 1962), mais c'est seulement en 1979 que le virus de la peste des petits ruminants est définitivement classé dans le genre *Morbillivirus* au sein de la famille *Paramyxoviridae* et différencié du virus de la peste bovine (Gibbs et al., 1979).

La PPR est incluse dans un groupe de maladies animales économiquement importantes, qui doivent être déclarées à l'OIE. Actuellement, le virus de la PPR est en voie d'expansion et ne fait l'objet d'aucun programme mondial d'éradication. De plus, les conséquences économiques des épidémies de PPR restent difficilement quantifiables (Diallo, 2004 ; Diallo, 2006 ; Abubakar et al., 2011) et cette maladie reste certainement une des principales limitations dans l'élevage des petits ruminants dans les pays du Tiers-Monde (Taylor, 1984).

#### 2.1.7.2.2 Répartition géographique

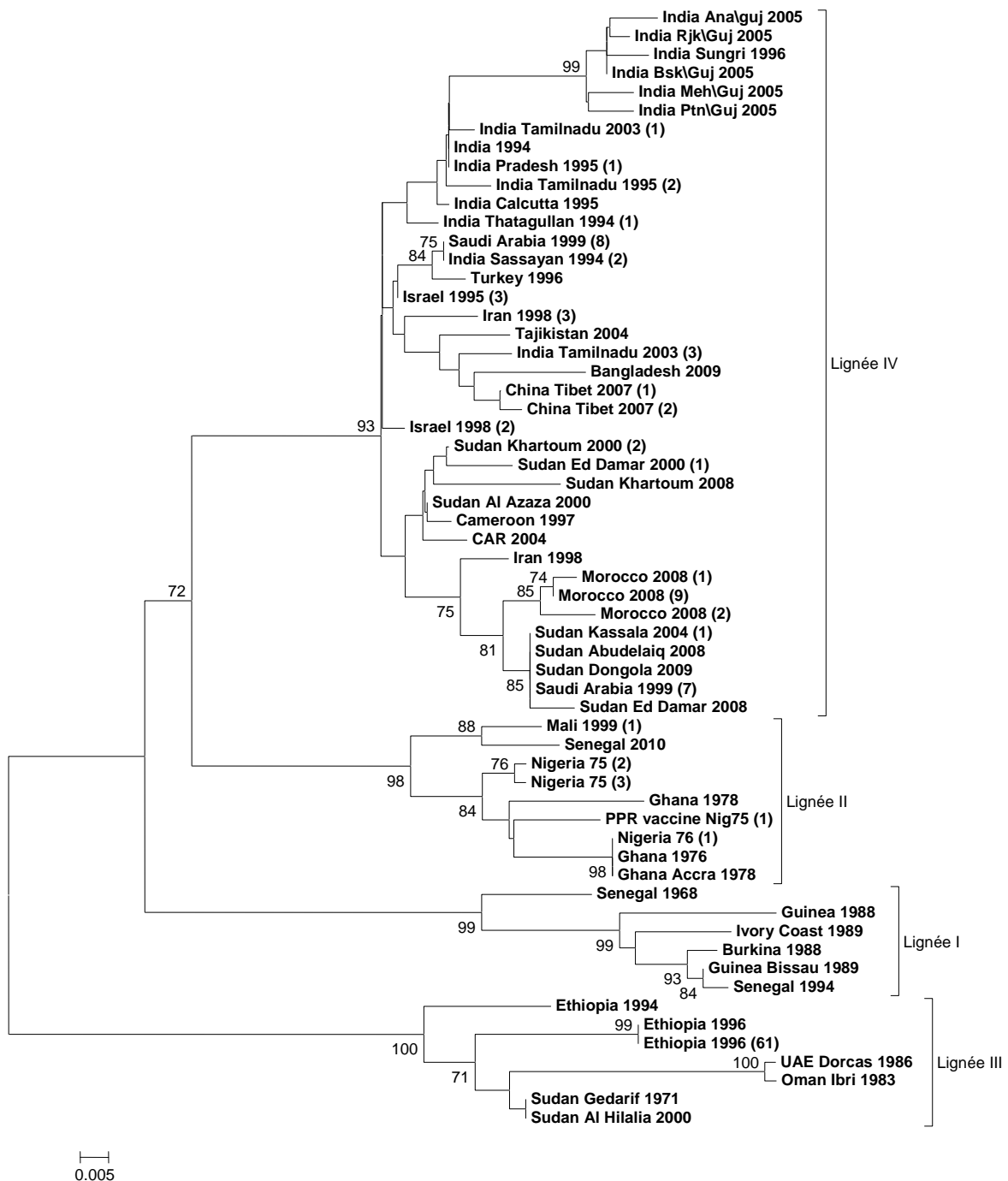
La PPR a été longtemps considérée comme une maladie spécifique de l'ouest africain jusqu'en 1984 où sa présence au Soudan a été détectée (El Hag Ali & Taylor, 1984), prolongeant l'aire d'infection endémique à la partie orientale du continent. La PPR est également présente au Moyen-Orient, en Iran, en Inde, en Turquie et dans quelques pays d'Asie centrale (Kwiatek et al., 2007). Son extension au nord du Sahara s'est récemment produite avec l'épizootie marocaine de juillet 2008 (Dufour et al., 2009). En Tunisie, Ayari-Fakhfakh et al. (2011) ont rencontré pour la première fois des sérologies positives (7,6%). Plus récemment, en mars 2011, l'Algérie a déclaré pour la première fois des foyers de PPR (selon les données de l'OIE). La PPR semble progresser également dans le territoire asiatique, puisqu'au Vietnam des sérologies positives ont été détectées (Maillard et al., 2008). De plus, Israël vient de notifier à l'OIE la résurgence de la PPR dans son territoire, la précédente apparition de cette maladie datant de 2006. La Figure 10 montre l'actuelle distribution géographique du PPRV. Cette expansion de la répartition géographique de la PPR peut être la conséquence du développement et de l'utilisation des outils de diagnostic spécifiques, qui permettent de distinguer la PPR d'autres maladies présentant des signes semblables (Diallo et al., 2007). Cependant, l'augmentation de cette incidence au cours des dernières années, aussi bien en Asie qu'en Afrique de l'Est, correspond également à la propagation de la maladie à des zones jusqu'alors indemnes. Un changement dans le pouvoir pathogène du virus, comme cause possible de la recrudescence de PPR, n'est pas à exclure (Roeder et al., 2000). Présente au Maghreb, l'introduction de la PPR en Europe est désormais un risque potentiel à ne pas négliger, surtout pour les pays d'Europe du sud, avec lesquels les échanges existent depuis longtemps, notamment l'Espagne où les cheptels ovin et caprin sont importants (Minet et al., 2009).



**Figure 10. Distribution géographique des différentes lignées du PPRV.**

L'analyse phylogénétique des souches du virus de la PPR, isolées des différentes régions géographiques, basée sur le gène de la protéine F et de la protéine N, définit quatre lignées distinctes (Figure 10 ; Kwiatek et al., 2007 ; Banyard et al., 2010 ; Kwiatek et al., 2011). La lignée I est représentée par des virus isolés en Afrique dans les années 70 (souches du Nigéria et souche sénégalaise). La lignée II inclut des virus isolés vers la fin des années 80 en Afrique de l'ouest (Côte d'Ivoire et Guinée). La lignée III est une combinaison des isolats d'Afrique Orientale (du Soudan et d'Ethiopie) ainsi que de la partie sud de la péninsule arabique (Oman, Emirats Arabes Unis). La lignée IV regroupe les isolats circulant principalement en Asie, Moyen et Proche-Orient, comme les isolats d'Israël, d'Iran, du Népal, du Bangladesh et d'Inde. Cette dernière lignée a également été rapportée en Afrique de l'Est, au Soudan, où elle a été rétrospectivement mise en évidence par typage génétique

dès le début des années 2000, mais aussi en Turquie en 2002 (Ozkul et al, 2002) et plus récemment au Maroc en 2008 (Dufour et al., 2009).



**Figure 11. Arbre Phylogénétique des différentes souches de PPRV basé sur une séquence partielle du gène de la nucléoprotéine (d'après Banyard et al., 2010).**

#### 2.1.7.2.3 Epidémiologie

La peste des petits ruminants est une maladie très contagieuse pour les petits ruminants, touchant principalement les chèvres, les moutons mais aussi les dromadaires et quelques espèces de ruminants sauvages (Furley et al., 1987 ; Roger et al., 2001 ; Kwiatek et al., 2011). Le virus de la PPR présente différents niveaux de virulence entre les moutons et les chèvres. Les chèvres sont sévèrement affectées, tandis que les moutons subissent généralement une forme plus légère de la maladie (Lefèvre & Diallo, 1990 ; Diallo, 2003b). Chez les caprins, il existe des prédispositions liées à la race (Diallo, 2003b). L'âge intervient aussi et les jeunes animaux semblent plus sévèrement touchés que les adultes (Lefèvre et Diallo, 1990). Les bovins développent des infections inapparentes (Nawathe & Taylor, 1979 ; Rossiter & Wardley, 1985). Parmi les animaux sauvages, la maladie a été diagnostiquée chez les Gazellinés (*Gazella dorcas*, *Eudorcas thomsonii*, *Gazella subgutturosa marica*, *Gazella gazella cora*, *Antidorcas marsupialis* et *Gazella gazella*), les Caprinés (*Capra nubiana*, *Ovis gmelini laristani*, *Capra falconeri* et *Ammotragus lervia*) et les Hippotraginés (*Oryx gazella*), ainsi que chez les antilopes (*Antilopa cervicapra*, *Tragelaphus scriptus* et *Aepyceros melampus* ; Furley et al., 1987 ; Lefèvre et Diallo, 1990 ; Elzein et al., 2004 ; Chauhan et al., 2009 ; Kinne et al., 2010). Le cerf de Virginie (*Odocoileus virginianus*) est très sensible aux infections expérimentales, mais il peut aussi se contaminer par contact étroit avec un autre animal infecté (Hamdy & Dardiri, 1976). Des descriptions de cette maladie chez le buffle indien (*Bubalus bubalus*) sont également existantes (Govindarajan et al., 1997). De plus, des enquêtes sérologiques de terrain ont mis en évidence la présence d'anticorps anti-PPRV chez d'autres espèces sauvages comme par exemple chez les céphalopodes de Grimm (*Sylvicapra gramma*) au Nigéria (Ogunsanmi et al., 2003). A ce jour, aucun portage sain du PPRV n'a été clairement démontré (Lefèvre & Diallo, 1990 ; Rodostits et al., 2007). Par ailleurs, l'excrétion des particules virales a été détectée dans les fèces de chèvres infectées par le PPRV jusqu'à 12 semaines après guérison. Néanmoins, aucune infectiosité résiduelle n'a été mise en évidence (Ezeibe et al., 2008).

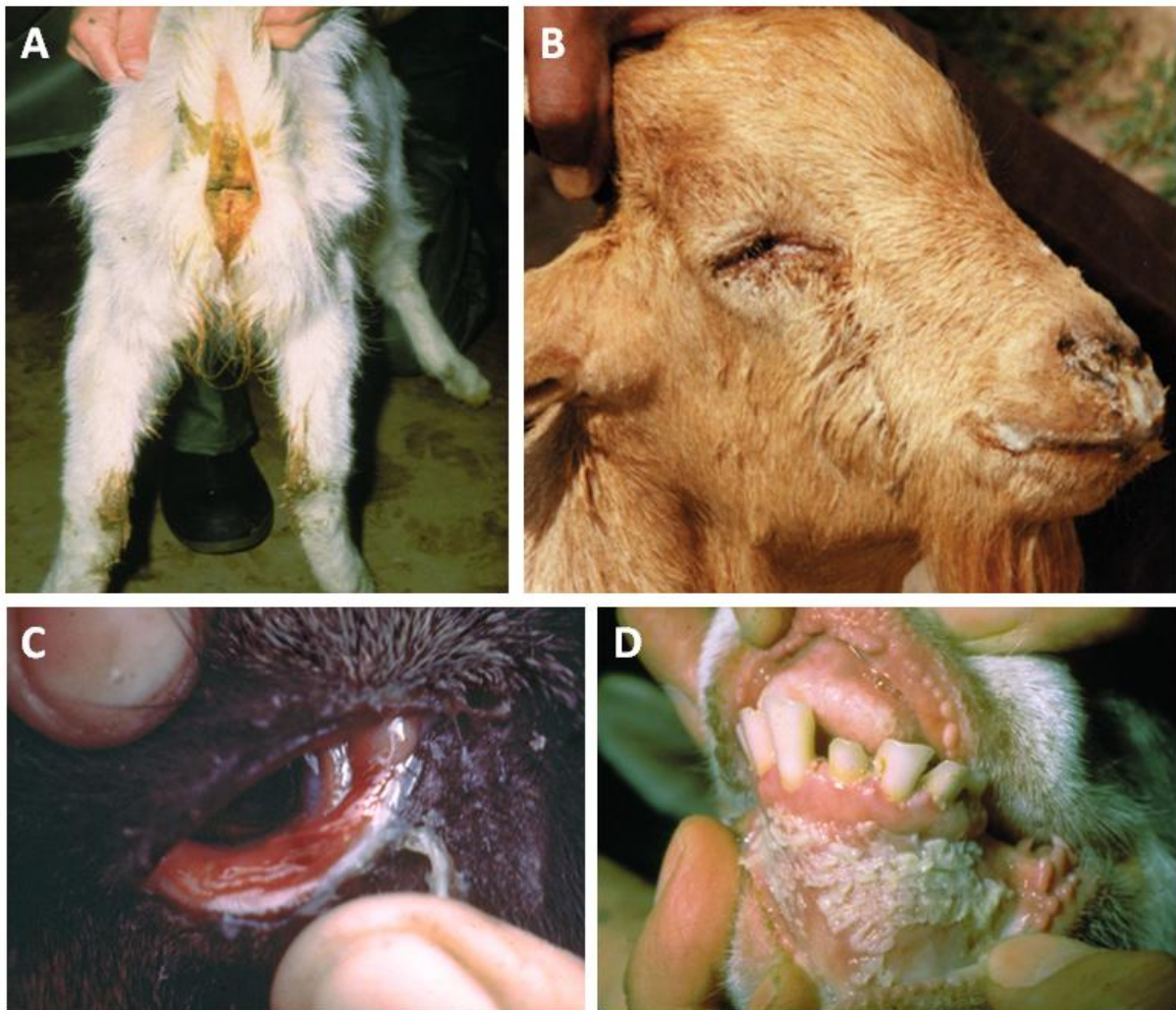
Les foyers de PPR sont plus fréquents pendant la saison fraîche, au début de la saison des pluies et, dans les pays musulmans, juste après la fête du sacrifice du mouton (Diallo, 2003b). De plus, la maladie peut présenter une évolution cyclique dans les foyers épizootiques qui pourrait s'expliquer par le fait qu'un animal ayant survécu à un épisode de PPR ou ayant été vacciné est protégé à vie contre une nouvelle infection (Diallo, 2006). Ainsi, l'apparition de nouveaux foyers nécessiterait un renouvellement suffisant du troupeau

par des animaux réceptifs (Dufour, 2010). Ce renouvellement a lieu en moyenne tout les trois ans, ce qui correspond à la durée de vie économique moyenne d'un petit ruminant. En remplaçant 90 à 100% des petits ruminants d'un troupeau par des animaux sensibles, la situation devient à nouveau favorable à l'apparition de la maladie (Diallo, 2003b).

#### 2.1.7.2.4 Pathogénie

L'infection naturelle par le virus de la PPR débute principalement par le nasopharynx à la suite de l'inhalation d'aérosols contenant des particules virales ou par la voie oropharyngée après ingestion d'aliments ou de boissons contenant des particules virales (Rossiter, 2004). La transmission est faite par contact direct avec les sécrétions et excréments des animaux infectés (Chauhan et al., 2009). Le virus se multiplie dans les ganglions lymphatiques et dans l'oropharynx avant de se propager à travers le sang et la lymphe à d'autres tissus et organes comprenant les muqueuses digestives, pulmonaires et aux voies respiratoires supérieures via les monocytes, les macrophages ou les cellules dendritiques (Appel & Summers, 1995 ; Murphy et al., 1999 ; Lefèvre, 2003 ; Rossiter, 2004). Tous les lymphocytes, les macrophages et les cellules réticulaires peuvent être des cibles cellulaires de la multiplication virale (Minet et al., 2009). Le virus peut être présent dans les larmes, dans l'écoulement nasal, dans l'expectoration et dans toutes les sécrétions et excréments provenant des animaux malades ou en phase d'incubation (Bundza et al., 1988; Taylor, 1984 ; Lefèvre et Diallo, 1990 ; Abubakar et al., 2011).

L'expression clinique de la PPR est variable en fonction de la race, du statut immunitaire de l'animal, de son âge, mais également de la présence d'éventuelles autres infections intercurrentes (Roeder et al., 2000). La maladie provoque fièvre, anorexie, diarrhées, écoulements nasaux et oculaires, lésions buccales et le plus souvent la mort de l'animal (Figure 12 ; Lefèvre et Diallo, 1990 ; Forsyth & Barrett, 1995 ; Diallo et al., 2007). La caractéristique principale de la pathogénie est l'immunosuppression profonde mais passagère induite par le virus avec pour conséquence, l'augmentation de la susceptibilité aux infections opportunistes et la mortalité (Schneider-Schaulies et al., 2001 ; Rajak et al., 2005). Après cette immunosuppression profonde de courte durée, le rétablissement de l'animal est habituellement suivi par l'acquisition d'une immunité forte, protectrice, spécifique et durable (Servet-Delprat et al., 2003 ; Cosby et al., 2005).



**Figure 12. Signes cliniques des animaux atteints de la peste des petits ruminants (d'après Roeder et al., 2000).** (A) diarrhée, (B) écoulements nasaux, (C) écoulements oculaires, (D) lésions buccales

La PPR montre un taux de morbidité qui peut varier de 10 à 80% et une mortalité entre 0 et 90% (Lefèvre & Diallo, 1990). Ces taux sont habituellement bas dans des secteurs endémiques, où la mortalité atteint entre 0-20% et la présence d'anticorps spécifiques dans le sérum des animaux est parfois le seul indicateur de l'infection (Kwiatek et al., 2007).

#### a) Formes cliniques

Classiquement la PPR est une maladie aiguë. Cependant, elle peut se manifester sous quatre formes cliniques : suraiguë, aiguë, subaiguë ou chronique et inapparente (Taylor, 1984 ; Diallo, 2003b ; 2005 ; Taylor et Barrett, 2007). Toutes ses formes sont habituellement accompagnées de lymphopénie et d'immunosuppression transitoires mais profondes,

aboutissant à des infections secondaires et opportunistes (Appel & Summers, 1995 ; Murphy et al., 1999). Comme dans la plupart des maladies, les quatre formes peuvent évoluer ensemble au sein d'un même troupeau (Diallo, 2005).

Dans la forme suraiguë, la phase d'incubation est d'environ deux à trois jours et elle est observée surtout chez les jeunes caprins de plus de trois à quatre mois. La maladie débute par la brusque apparition d'une forte hyperthermie. L'animal atteint est sévèrement abattu et ne s'alimente plus. Les muqueuses buccales et oculaires deviennent très congestionnées. Un ou deux jours après le début de la fièvre, apparaissent le larmolement et le jetage séro-muqueux, suivis d'une diarrhée profuse. L'issue de la maladie sous cette forme est toujours fatale. La mort est brutale en raison d'une déshydratation importante, observée cinq à six jours après l'apparition des symptômes.

Dans la forme aiguë de la maladie, après une incubation de cinq à six jours, les animaux présentent une augmentation brusque de la température corporelle, ainsi que la congestion des différentes muqueuses. Les signes cliniques de la forme précédente sont retrouvés mais de façon un peu moins accentués. L'évolution de la maladie est également moins rapide, ce qui permet l'apparition d'autres signes cliniques. Lorsqu'une infection bactérienne opportuniste survient, les écoulements séro-muqueux deviennent mucopurulents et l'exsudat catarrhal profus se dessèche et obture les narines, ce qui rend la respiration difficile. Les signes de broncho-pneumonie s'accompagnent de toux. Quatre à cinq jours en moyenne après le début des symptômes, la température de l'animal commence à diminuer. Apparaissent ensuite la diarrhée profuse non hémorragique et les lésions érosives couvertes de tissu nécrotique blanchâtre sur la muqueuse buccale et vulvaire. Chez les femelles, l'avortement est fréquent. L'haleine de l'animal devient fétide. Au bout de deux ou trois jours de diarrhée, l'animal fatigué reste couché, ne bouge plus avec les yeux mi-clos et est indifférent à tout ce qui l'entoure. Une hypothermie précède la mort de l'animal observée environ à dix jours après le début des symptômes. La mort survient dans 70-80% des cas. Les animaux qui survivent à cette forme de la maladie traversent une période de convalescence d'environ une semaine.

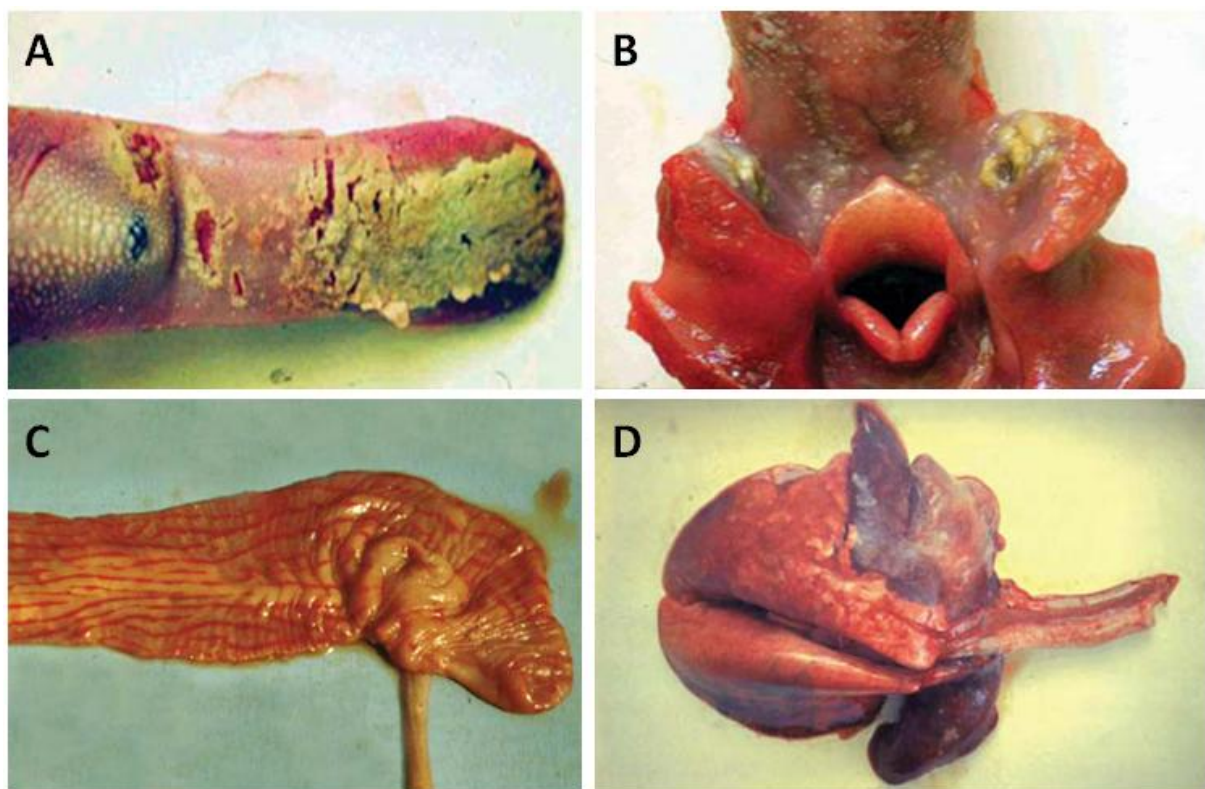
La forme subaiguë ou chronique se caractérise par des signes cliniques légers. La période d'incubation est d'environ cinq jours. Les animaux atteints de cette forme présentent une faible hypothermie pendant un à deux jours, du jetage et du larmolement peu abondants. La maladie peut être confondue avec l'ecthyma contagieux en raison des croûtes formées par les produits de jetage desséchés qui entourent les naseaux. Les animaux atteints de cette forme de la maladie guérissent.



Il existe aussi une forme inapparente qui est la plus fréquente dans les zones sahéliennes et ne peut être révélée que par des enquêtes sérologiques.

#### b) Tableau lésionnel

Le tableau lésionnel d'un animal mort suite à une infection par PPRV est dominé par des lésions de l'appareil digestif et respiratoire (Figure 13). La carcasse est souvent émaciée. Le train arrière est souillé de matières fécales molles ou liquides. Les globes oculaires sont enfoncés dans les orbites. La présence de croûtes sèches autour des yeux et des narines est observée (Bundza et al., 1988 ; Brown et al., 1991 ; Brown & Torres, 1994 ; Rajak et al., 2005 ; Kul et al., 2007).



**Figure 13. Lésions macroscopiques des animaux atteints de la peste des petits ruminants.** (A) Lésions nécrotiques sur la langue d'une chèvre, (B) Mucopus à la base de la langue, (C) Stries zébrées dans le gros intestin d'une chèvre, (D) Pneumonie avancée chez un mouton. D'après Diallo, 2005 (A et B) ; Roeder et al., 2000 (C et D).

En ce qui concerne l'appareil digestif, les lésions érosives et ulcératives dans la cavité buccale sont les plus marquantes avec des foyers de nécrose tissulaire sur la langue, les gencives et le palais, ainsi que sur le pharynx et l'œsophage. La muqueuse intestinale est

fortement congestionnée et même hémorragique. Ces lésions sont importantes sur le côlon et le rectum et ont un aspect de stries zébrées.

La gravité de l'atteinte de l'appareil respiratoire dépend des infections associées. Lors de la broncho-pneumonie secondaire (classique de la forme aiguë), la trachée peut contenir un liquide spumeux ou du mucopus, avec une membrane très congestionnée. Les lésions de pneumonie siègent surtout sur les lobes apicaux et cardiaques des poumons qui ont un aspect rouge pourpre et sont durs au toucher.

Par ailleurs, une atteinte lésionnelle des organes lymphoïdes est également rapportée avec œdème et friabilité des nœuds lymphatiques et lésions nécrotiques fréquentes sur les plaques de Peyer. La rate est aussi congestionnée.

L'analyse microscopique des épithéliums digestifs montre une vacuolisation cellulaire associée à une infiltration par des polynucléaires. L'observation de noyaux pycnotiques et de syncytia est également fréquente. Une coloration histologique classique (hémalum-éosine) met en évidence des inclusions éosinophiles intracytoplasmiques et parfois intranucléaires. Le parenchyme pulmonaire est infiltré par des neutrophiles et des macrophages, de façon majeure au niveau des bronchioles. De plus, des colonies bactériennes et des dépôts de fibrine sont retrouvés dans les foyers de broncho-pneumonie.

#### 2.1.7.2.5 Diagnostic

Les signes évocateurs de la PPR sont : l'apparition brusque d'un état fébrile sur des chèvres et/ou moutons, la congestion de différentes muqueuses associées aux jetages et aux larmolements, les lésions érosives nécrotiques de la muqueuse buccale, les signes de broncho-pneumonie, la diarrhée et la mortalité plus ou moins élevée. Ces différents symptômes peuvent ne pas être présents sur un même individu, d'où la nécessité d'inspecter l'ensemble du troupeau. Aucun de ces signes n'est spécifique de la PPR, ce qui donne une grande importance au diagnostic différentiel avec d'autres maladies (Diallo, 2003b ; 2005).

La PPR a été longtemps ignorée dans beaucoup de régions au profit de la peste bovine et de la pasteurellose, maladies avec lesquelles elle partage des symptômes identiques. En fait, la pasteurellose est le plus souvent une complication de la PPR (Rossiter & Taylor, 1994 ; Diallo, 2005). La PPR peut se confondre aussi avec la peste bovine vue que ces deux maladies sont remarquablement semblables en termes de clinique chez leurs hôtes respectifs. La confusion est possible quand les symptômes de la peste bovine

apparaissent chez les petits ruminants, compte tenu de la réceptivité de ces derniers au virus bovinepestique, mais ces animaux sont moins susceptibles que les bovins (Plowright, 1952 ; Couacy-Hymann et al., 1995). Le diagnostic différentiel doit également être fait pour la pleuropneumonie contagieuse caprine et l'ecthyma contagieux du mouton (Tableau 3). Pour différencier la PPR de ces maladies il est indispensable de faire appel aux diagnostics de laboratoire.

**Tableau 3. Principales caractéristiques pour le diagnostic différentiel de la PPR (Diallo, 2005).**

	<b>Signes communs avec la PPR</b>	<b>Signes excluant la PPR</b>	<b>Lésions communes avec la PPR</b>	<b>Lésions excluant la PPR</b>
<b>Peste bovine (PB)</b>	Congestion des muqueuses, lésions érosives, jetage, larmolement, fièvre, diarrhée	Absence de signes respiratoires	Lésions érosive des muqueuses, lésions congestives, voire hémorragiques de l'intestin	Pas de broncho-pneumonie
<b>Pasteurellose</b>	Signes respiratoires, fièvre	Pas de diarrhée	Broncho-pneumonie	Pas de lésions ulcératives des muqueuses
<b>Pleuropneumonie contagieuse caprine (PPCC)</b>	Signes respiratoires, jetage, fièvre	Pas de lésion ulcératrice des muqueuses et pas de diarrhée	Lésions pulmonaires	Lésions pulmonaires plus diffuses pour la PPCC, avec liquide pleural fibrineux
<b>Ecthyma contagieux du mouton (ECM)</b>	Croûtes labiales, signes de pneumonie et diarrhée rares mais possible, fièvre	Papules et vésiculo-pustules, parfois lésions mammaires et/ou podales	Pneumonie possible, parfois lésions ulcératrices sur la langue et sur le palais (forme buccale de la maladie)	Papules au niveau de la muqueuse buccale, lésions pustuleuses podales, mammaires

Lors de la suspicion de la peste des petits ruminants, un certain nombre de prélèvements doivent être effectués et servir à la confirmation de l'infection par des tests de laboratoire. Il est toujours conseillé de réaliser ces prélèvements sur le plus grand nombre d'animaux présents dans le foyer, que ceux-ci soit vivants et présentant des symptômes marqués, qu'ils aient succombés à la maladie ou encore qu'ils aient été euthanasiés. Sur les animaux vivants, il est conseillé de prélever des écouvillonnages de larmes et de jetage, du sérum pour les analyses sérologiques, du sang total et éventuellement des biopsies ganglionnaires. Sur les animaux morts ou sacrifiés, les prélèvements de la rate, des poumons, de l'intestin et des ganglions lymphatiques doivent être réalisés de préférence dans les deux heures qui suivent la mort. Il est important que les prélèvements soient bien conditionnés à la bonne température et envoyés au laboratoire dans les plus brefs délais (Lefèvre et Diallo, 1990 ; Diallo, 2003b ; 2005).

Les procédures pour l'identification de l'agent sont basées sur des méthodes classiques de diagnostic de laboratoire : à travers des tests d'immunodiffusion en gélose (Obi, 1984 ; Abraham & Berhan, 2001), d'immunofluorescence, d'immunocapture, ainsi que des méthodes moléculaires comme la PCR, actuellement plus répandues (Forsyth & Barrett, 1995 ; Couacy- Hymann et al., 2002 ; Abubakar et al., 2011). Cependant, le diagnostic de référence reste l'isolement et l'identification du virus sur cellules primaires de rein ou de poumon de mouton ou sur lignée cellulaire Vero (Hamdy et al., 1976 ; Taylor, 1984). Les cellules Vero exprimant le récepteur CD150 humain et les cellules CV1 exprimant la protéine SLAM des moutons et des chèvres semblent avoir une meilleure sensibilité (Minet et al., 2009 ; Adombi et al., 2011). Le diagnostic sérologique est recommandé par l'OIE dans le cadre d'échanges commerciaux d'animaux. Deux tests peuvent être utilisés : la séroneutralisation virale (Rossiter, 1994) et des test ELISA de compétition (Libeau et al., 1992 ; 1994 ; 1995). Le Tableau 4 synthétise les principales caractéristiques de ces tests, sachant que le résultat d'un test devrait être confirmé par celui d'au moins un autre.

**Tableau 4. Caractéristiques des techniques de diagnostic de la PPR (d'après Diallo, 2005).**

	<b>Test</b>	<b>Délai</b>	<b>Sensibilité</b>	<b>Spécificité</b>
<b>Virus</b>	Immunodiffusion en gélose	1-2 jours	Faible	Réaction croisée avec la PB
	Immunofluorescence	2 heures	Sensible	Spécifique avec monoclonaux
	Immunocapture	2-3 heures	Très sensible	Très spécifique
	PCR	5-6 heures	Très sensible	Très spécifique
	Isolement du virus	10-21 jours	Difficile et succès incertain	Identification à faire par un autre test
<b>Anticorps</b>	Séroneutralisation (SN)	10-15 jours	Sensible	Nécessité de faire SN avec PPRV et virus de la PB
	ELISA	3-4 heures	Sensible	Croisements PPR/PB, départagé avec test PB

#### 2.1.7.2.6 Contrôle et traitements

Il n'y a aucun traitement spécifique pour la PPR. Néanmoins la mise en place d'un traitement symptomatique ainsi que la gestion des complications microbiennes et parasitaires permettraient de diminuer le taux de mortalité. Toutefois, ces traitements coûteux et aux résultats aléatoires ne peuvent être envisageables que sur un petit nombre d'animaux de grande valeur.

Le contrôle de la PPR dans les pays non infectés peut être réalisé en utilisant des mesures classiques telles que la restriction de l'importation des moutons et des chèvres de régions infectées et la quarantaine (Abubakar et al., 2011). La prophylaxie sanitaire est recommandée lorsque la maladie apparaît dans un pays précédemment indemne de la peste des petits ruminants. Selon la réglementation européenne, elle serait assurée par des mesures sanitaires classiques, avec abattage et destruction des animaux sensibles au sein du foyer, mise sous surveillance des cheptels en lien épidémiologique et définition d'une zone de protection et d'une zone de surveillance (dans un rayon minimal de trois et dix kilomètres,

respectivement). Ces zones devaient être maintenues au moins trois semaines après le nettoyage et la désinfection de l'exploitation infectée.

Des vaccins ont été ou sont en train d'être développés pour le contrôle de la PPR (Diallo et al., 2007). En effet, les virus de la PB et de la PPR partagent entre eux une très forte réaction croisée tant sur le plan sérologique que sur le plan de la protection. Ceci permet d'expliquer le succès de l'utilisation dans le passé du virus atténué bovipestique comme vaccin hétérologue contre la PPR (Bourdin et al., 1970 ; Taylor, 1979 ; Taylor et al., 1990 ; Rossiter & Taylor, 1994) jusqu'à l'obtention et la mise sur le marché d'un vaccin homologue (Diallo et al., 1989). Ce vaccin a été obtenu par atténuation de la souche virale PPR Nigéria 75/1 par passages successifs sur cellules Vero (Diallo et al., 1989). Sur le terrain, aucun effet secondaire tel qu'avortement ou transmission du virus vaccinal par les animaux vaccinés, n'a été enregistré. Les anticorps anti-PPRV produits par les animaux vaccinés persistent pendant au moins trois années (Diallo, 2003c), c'est-à-dire pendant toute la durée de vie économique moyenne d'un petit ruminant.

Un inconvénient sérieux à l'utilisation efficace du vaccin atténué contre le PPRV est le fait que ce virus est très sensible à la chaleur et que les secteurs endémiques présentent un environnement climatique chaud. Depuis, ces régions ont habituellement des difficultés à maintenir une chaîne du froid pour assurer la conservation et maintien du vaccin (Diallo et al., 2007). Pour pallier à cet inconvénient, Worral et ses collaborateurs (2001) ont mis au point un vaccin thermostable en associant un cryoprotecteur au vaccin homologue. Ce vaccin est stable à 45°C pendant 14 jours avec une perte minimale de son pouvoir immunogène. Un vaccin semblable a été produit en Inde utilisant une souche locale de le PPRV (Sarkar et al., 2003).

Un autre inconvénient important dans l'emploi des vaccins classiques est l'impossibilité de différencier la réponse anticorps induite par le vaccin de celle induite par une infection naturelle. Ceci rend la séro-surveillance de la maladie impossible dans les secteurs endémiques où un programme de vaccination a été mis en application (Diallo et al., 2007). Une manière de contourner cette difficulté serait de disposer de vaccins DIVA, acronyme utilisé pour les vaccins permettant la différenciation entre animaux infectés et vaccinés (van Oirschot, 1999).

Enfin, grâce aux progrès de la génétique moléculaire, de nouveaux outils thérapeutiques sont en cours de développement. En effet, la lutte contre la peste des petits ruminants pourrait se baser sur la technologie de l'interférence ARN (ARNi), mise en place au Cirad dès 2005. Des duplexes d'ARN interférents capables d'inhiber *in vitro* au moins

80% de la réplication virale ont été identifiés (Servan de Almeida et al., 2007 ; Keita et al., 2008).

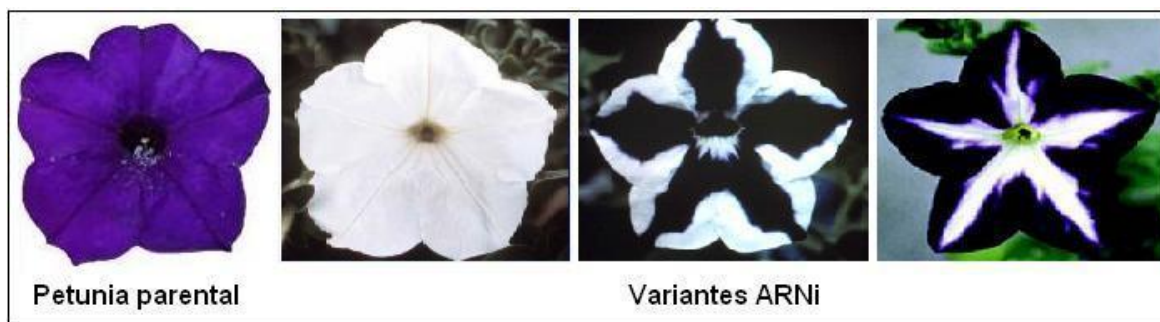
## 2.2 L'interférence ARN (ARNi)

L'interférence ARN est un processus d'inhibition de l'expression de gènes cibles spécifiques de la séquence, déclenché par des petits ARN double brin (Sharp, 1999 ; Gitlin et al., 2002 ; Hannon, 2002). Ce mécanisme, hautement conservé entre espèces (Elbashir et al., 2001a ; Kim et al., 2005), semble avoir un rôle naturel dans la régulation fine des gènes y compris ceux étrangers à la cellule comme les éléments transposables et les gènes viraux (Carmichael, 2002 ; Ding et al., 2004 ; Saksela, 2003). L'ARNi constitue actuellement la méthode de choix pour l'extinction spécifique de l'expression d'un gène dans le but d'étudier sa fonction ou de traiter une maladie liée à ce gène (Sharp, 1999 ; Hannon, 2002).

### 2.2.1 Historique

Le phénomène de l'interférence ARN a été découvert par l'équipe de Richard Jorgensen dès les années 1990 lors de ses recherches sur les mécanismes de coloration de pétunias (Napoli et al., 1990). Afin d'obtenir un renforcement de la coloration des fleurs, les botanistes ont introduit dans le génome de pétunias des copie du gène CHS (*chalcone synthase*) responsable de la pigmentation. Ils eurent la surprise de constater qu'au lieu d'obtenir la couleur pourpre attendue, la plupart des plantes exprimait des fleurs partiellement ou totalement blanches (Figure 14 ; Napoli et al., 1990). L'analyse des ARNs isolés à partir des fleurs blanches a montré que les ARNm correspondant au gène d'intérêt étaient présents en quantité beaucoup plus faible que dans les fleurs contrôles. Ainsi, non seulement l'expression du transgène était dérégulée, mais également celle de l'endogène homologue. À l'époque, ce phénomène fut qualifié de co-suppression. Quelques temps plus tard, des études similaires sur les champignons *Neurospora crassa*, aboutirent aux mêmes effets : ainsi, l'ajout de séquences géniques supplémentaires du gène albino-1 impliqué dans la biosynthèse du carotène, aboutissait à l'extinction de leur expression (Cogoni et al., 1996 ; Cogoni & Macino, 1997).





**Figure 14. Variation de la couleur des pétunias en fonction de l'extinction du gène de la pigmentation par l'interférence ARN.** La fleur de gauche représente le pétunia parental et celles de droite quelques variantes observées par Napoli et al. lors de leurs travaux en 1990.

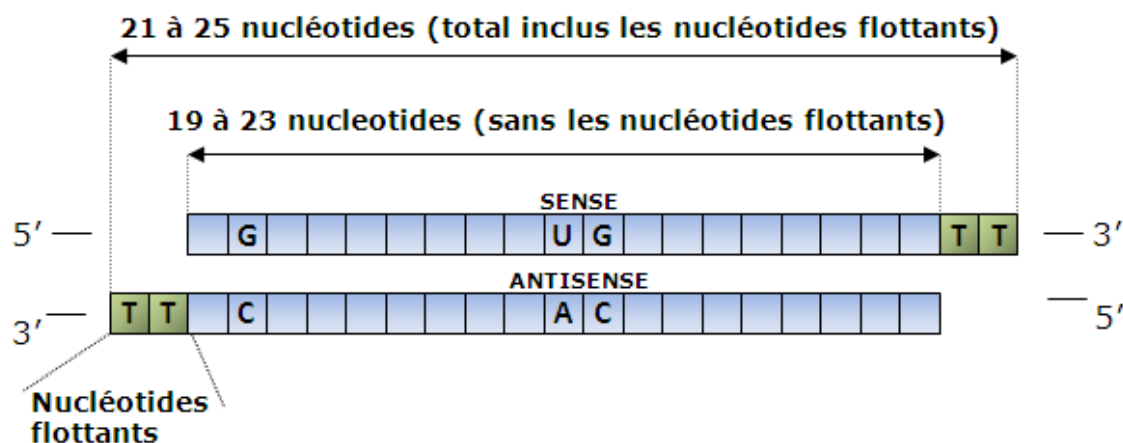
Le phénomène fut observé dans le règne animal lors d'études visant à inhiber la fonction d'un gène chez le nématode *Caenorhabditis elegans* à l'aide d'ARN antisens (Guo et Kemphues, 1995). Les ARN antisens se lient à des régions spécifiques (complémentaires) dans l'ARNm afin de bloquer la transcription. Les auteurs constatèrent que des ARN sens étaient aussi efficaces pour inhiber l'expression du gène cible que les ARN antisens. Cette observation fut élucidée par le groupe d'Andrew Fire et Craig Mello sur le nématode *C. elegans* (Fire et al., 1998). Ces auteurs démontrèrent que le mécanisme de l'extinction des gènes observés chez les végétaux et les nématodes est la conséquence de l'introduction dans les organismes d'ARN double brin complémentaire des gènes. Ce phénomène fut alors appelé interférence ARN (ARNi) et récompensé en 2006 par le prix Nobel de médecine.

A première vue, il semblait peu probable que ce mécanisme existe chez les mammifères. En effet, l'introduction d'ARN double brin dans les cellules provoque une forte réponse en interféron de type 1 (IF-1), non spécifique, induite par des mécanismes de protection cellulaire associés à l'activation des récepteurs TLR (*toll like receptor*). Ce n'est qu'en 2001 qu'Elbashir et al. montrèrent que la machinerie cellulaire impliquée dans le mécanisme de l'ARNi était possible chez les mammifères, car la production de l'IF-1 est dépendante de la taille de l'ARN double brin introduit (Elbashir et al., 2001a). De fait, l'introduction directe dans les cellules de mammifères d'oligonucléotides courts (de 21 à 23 bases), appelés siARN (*small interfering RNA*), pouvait bloquer spécifiquement l'expression du gène cible sans déclencher de réponse antivirale de type interféron. Depuis, d'autres études ont mis en évidence ce mécanisme dans d'autres espèces : les insectes (Kennerdell & Carthew, 1998), la grenouille (Oelgeschlager et al., 2000), la souris (Svoboda et al., 2000 ; Wianny & Zernicka-Goetz, 2000), entre autres.

Au-delà des siARNs, d'autres petits ARNs interférents appelés micro ARNs (miARN) ont été découverts. Ils sont fabriqués par la cellule elle-même à partir de son propre génome (Novina & Sharp, 2004). Ces miARNs proviennent de régions de l'ADN non codantes. Les miARNs utilisent le même système enzymatique que les siARNs et ont pour rôle d'inhiber la synthèse protéique en se liant à l'ARNm qui ne peut plus, dès lors, remplir son rôle. Un grand nombre de miARNs a été trouvé dans plusieurs organismes. On évalue leur nombre dans le génome humain à plusieurs centaines et leurs fonctions restent pour la plupart à élucider.

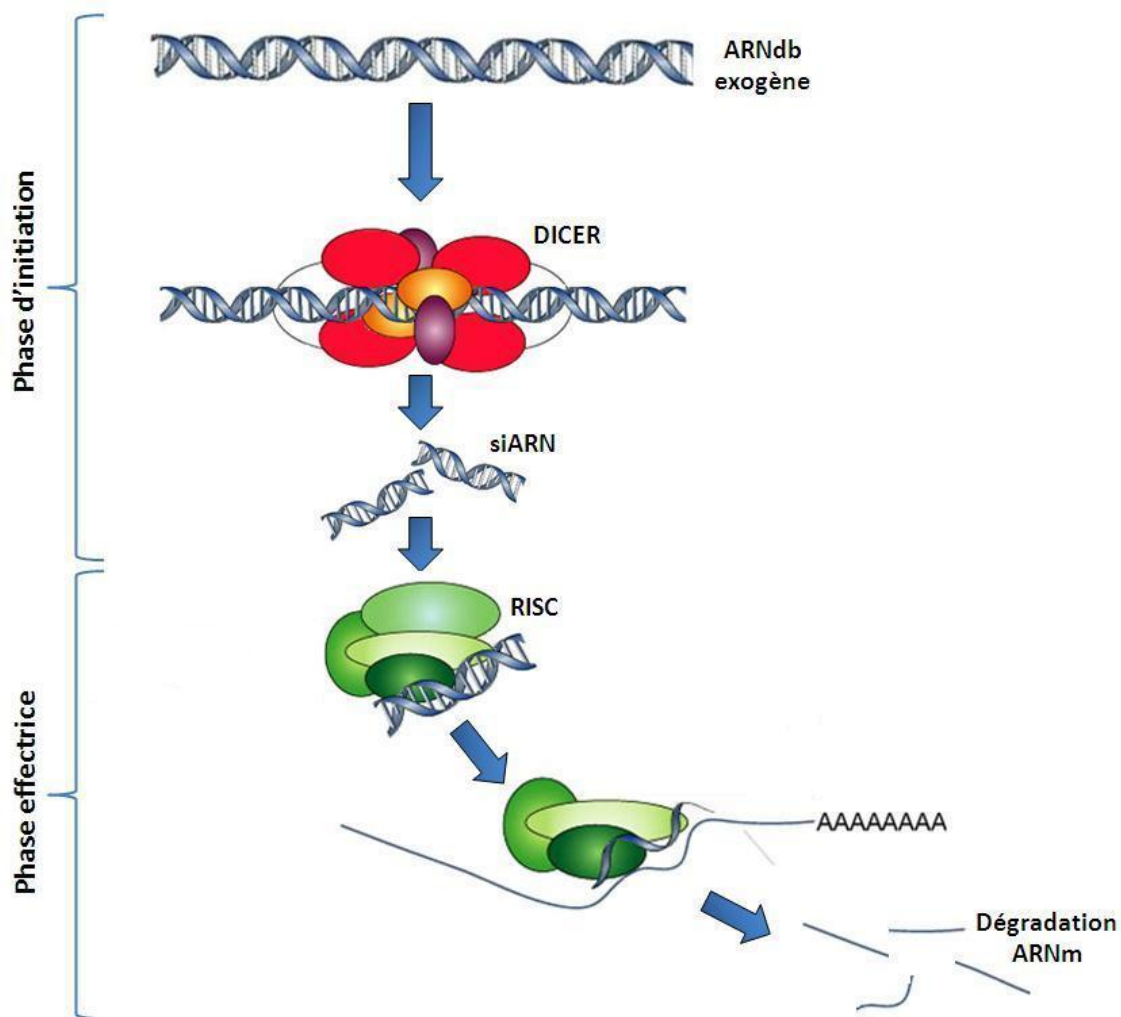
## 2.2.2 Mécanisme d'interférence par les siARN

Le principe général du mécanisme de l'interférence ARN est relativement simple et comporte deux phases principales : la phase d'initiation se produit dans le cytoplasme des cellules et consiste en la production de petits ARNs interférents à partir d'un ARNdb exogène ou d'un microARN. Dans cette phase, l'ARN double brin est reconnu par DICER, une endonucléase membre de la famille des ARNases III, qui le clive en petits fragments d'ARN, de 21 à 25 nucléotides avec des extrémités 3' symétriques comportant deux nucléotides flottants (Figure 15 ; Hamilton & Baulcombe, 1999 ; Hammond et al., 2000 ; Zamore et al., 2000 ; Bernstein et al., 2001 ; Hamilton et al., 2002). DICER n'agit pas sur une séquence spécifique, mais sur toute ARNdb. Les cations  $Mg^{2+}$  stabilisent la dimérisation du complexe DICER/ARNdb permettant que ce clivage s'effectue préférentiellement à l'extrémité la plus instable de l'ARNdb (Tuschl & Borkhardt, 2002).



*Figure 15. Schéma de la structure d'un siARN.*

La phase effectrice met en jeu une activité nucléasique qui neutralise l'ARNm cible en le coupant. La conséquence de cette étape est l'inhibition de l'expression du gène. Cette phase débute à travers le transfert des siARNs de DICER vers un complexe multi-protéique appelé RISC (*RNA-induced silencing complex*) constituant initialement un complexe inactif DICER/ARN/RISC. L'activité hélicase de RISC permettra la dissociation, dépendante d'ATP, des deux brins de l'ARN. DICER se détache et, par addition d'ATP, le siARN sens (ou passager) est éliminé et l'antisens (ou guide) est exposé (Figure 16). Le complexe utilise le brin antisens pour le guider vers sa cible (séquence complémentaire) dans l'ARNm. L'appariement parfait du siARN avec l'ARNm cible détermine la coupure endonucléolytique du second. Un appariement « imparfait » génère une boucle centrale et n'aboutit qu'au blocage de la traduction (Saxena et al., 2003). Le clivage de l'ARNm par RISC activé est endonucléasique et concerne seulement la région homologue au siARN (Tuschl & Borkhardt, 2002). L'ARNm ainsi fragmenté en ARNdb d'une vingtaine de nucléotides ne peut plus donner lieu à un processus de traduction et la protéine normalement codée par cet ARN n'est pas synthétisée. Les fragments générés sont ultérieurement clivés par des ARNases cellulaires.

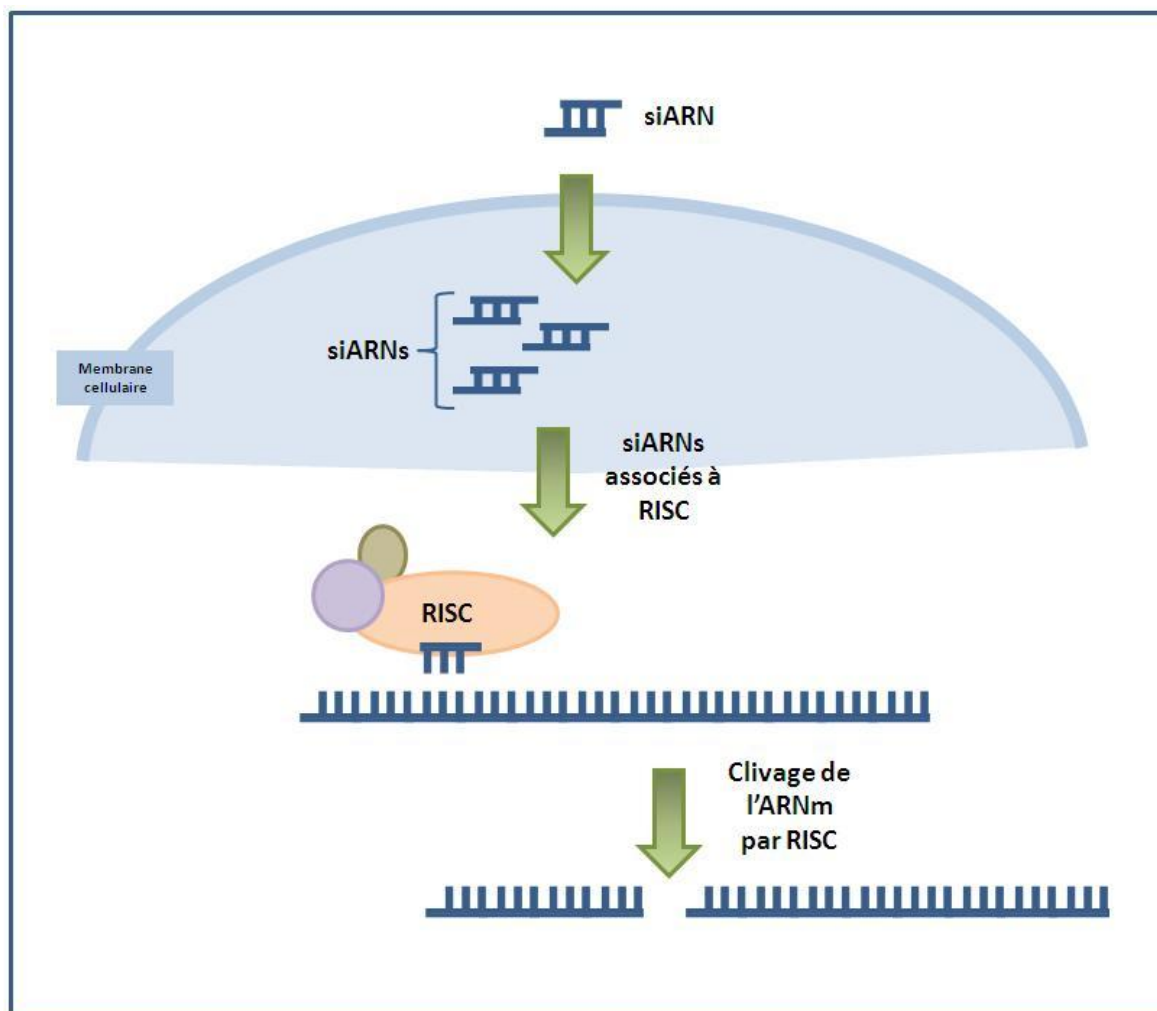


**Figure 16. Mécanisme d'action des siARN.**

L'inhibition de la production de protéines par le phénomène d'ARNi ne semble exiger au départ qu'une très faible quantité d'ARNdb. Il existe ensuite une étape d'amplification dans le phénomène d'interférence ARN (Stein et al., 2003). Il a été démontré chez certains organismes que l'ARNi implique la production de deux populations de siARN par l'intervention de l'ARN polymérase ARN-dépendante (Sijen et al., 2001). Le premier groupe de siARN (siARN primaires) provient de l'ARNdb initialement injecté et permet de rendre silencieux un ARNm par complémentation de séquence. La liaison siARN/ARNm cible induit le clivage de l'ARNm servant de signal à RdRp pour initier la synthèse de siARNs secondaires. Ces siARNs secondaires sont des ARN complémentaires de l'ARNm clivé, donc anti-sens. Ils sont synthétisés par RdRp à partir de l'extrémité 3'OH du siARN primaire anti-sens servant d'amorce sur l'ARNm cible (Nishikura, 2001 ; Sijen et al., 2001). Le résultat de cette réaction est la formation d'un nouvel ARNdb qui est alors utilisé comme substrat par DICER pour générer des siARN secondaires. Ces siARNs

secondaires contribuent à augmenter la dégradation de l'ARNm et l'extinction de l'expression du gène. Cette amplification de l'activité ARNi a été observée chez *C. elegans* (Sijen et al., 2001 ; Pak & Fire, 2007), les végétaux (Voinnet et al., 1998 ; Vaistij et al., 2002 ; Axtell et al., 2006) et les drosophiles (Lipardi et al., 2001). Cependant, les mammifères ne semblent pas posséder la capacité d'amplifier l'interférence ARN. En conséquence, la durée d'action des siARN dans la cellule de mammifères est limitée à quelques jours, en fonction de la quantité d'ARN initialement transfectée.

L'utilisation du mécanisme d'interférence ARN pour induire le *silencing* est une méthode qui permet de créer artificiellement des phénotypes de « perte de fonction » des gènes. Dans les cultures de cellules mammifères, l'ARNi peut être induit par des siARNs introduits directement dans la cellule par lipofection ou électroporation. Ces siARNs miment le produit généré par DICER lors de la phase d'initiation de l'ARNi naturelle (les miARNs ; Figure 17). Les ARN interférents peuvent également être introduits sous forme de structures en « épingle à cheveux » (shARN, short hairpin RNA). Ces structures peuvent être aussi produites par des cassettes d'expression insérées dans des plasmides transférés dans le cytoplasme cellulaire (McCaffrey et al., 2003) ou dans des vecteurs viraux (Banerjee et al., 2003 ; Uprichard et al., 2005). Ces shARNs, une fois dans les cellules, sont transformés en siARNs actifs par DICER. La transfection avec des plasmides ou l'infection avec des vecteurs viraux exprimant des shARN est avantageuse puisqu'elle produit de nombreuses copies de shARN et donc de molécules de siARN endogènes. Il en résulte un effet plus prononcé de l'ARNi et plus long dans le temps, en comparaison avec la transfection de siARN synthétisés chimiquement (McCaffrey et al., 2002).



**Figure 17. Mécanisme d'action des siARN induits artificiellement dans les cellules de mammifères.** Les siARNs introduits dans la cellule sont pris en charge directement par RISC qui les guide vers l'ARNm cible. Le but final est le clivage de l'ARNm par RISC et sa dégradation ultérieure.

### 2.2.3 Le choix de la séquence cible des siARNs

Il est essentiel pour une utilisation efficace des siARN que le choix de la séquence ciblée soit raisonné et respecte certaines règles (Ichim et al., 2004). Dès lors, il peut être difficile dans certains cas de trouver des cibles dans une région spécifique d'un génome. Les siARNs doivent également être sélectionnés pour leur spécificité. En particulier, il convient de s'assurer que le siARN sélectionné ne ciblera pas des ARNm de la cellule hôte.

De plus, l'introduction d'ARNdb de plus de 30 nucléotides active une réponse de type interféron dans les cellules mammifères (DeFranco et al., 2009). Ceci conduit donc à la dégradation non spécifique des ARNm et à une réduction générale de la traduction protéique

au sein de la cellule. Pour éviter ce genre de réaction, les siARNs synthétiques sont composés de moins de 30 nucléotides (Sui et al., 2002). Les études sur des extraits d'embryon de *D. melanogaster* ont prouvé que les ARN double brin de 21pb avec deux bases non appariées à l'extrémité 3' de chaque brin constitué d'un didesoxynucléotide « TT » (21+2), étaient les plus efficaces à déclencher l'ARNi *in vitro* (Figure 15 ; Elbashir et al., 2001b).

Il est suggéré que la région cible doit être éloignée d'au moins 70 à 100 nucléotides du site d'initiation de la traduction et que le contenu en GC doit être inférieur à 50% (Caplen & Mousses, 2003). En effet, le faible contenu en GC est corrélé avec une augmentation de l'efficacité du *silencing*. Cependant, il semblerait que les siARNs avec un fort taux de résidus GC au niveau de l'extrémité 3' du brin anti-sens et un faible taux à l'extrémité 5' soient plus efficaces (Chalk et al., 2004).

La stabilité intrinsèque des duplex de siARN joue un rôle essentiel dans le mécanisme d'ARN interférence (Zeng & Cullen, 2003 ; Westerhout et al., 2005). Khvorova et al. (2003) ont démontré que pour faciliter l'incorporation du brin sens dans le complexe RISC et ainsi le déroulement des doubles brins, il est nécessaire que la stabilité soit plus faible à l'extrémité 5' de l'anti-sens et plus forte à l'extrémité 3'.

Pour s'assurer d'une efficacité optimale des siRNAs, il existe enfin certaines règles à respecter quant à la composition nucléotidique des siARNs et le type de structures secondaires affectant et environnant la région cible de l'ARNm (Reynolds et al., 2004 ; Servan de Almeida et al., 2008). Il a été montré que les structures en forme « d'épingles à cheveux » et les cibles situées entre deux branches très étroitement liées pouvaient contribuer à l'inefficacité des siARNs (Yiu et al., 2005 ; Servan de Almeida et al., 2008). La composition nucléotidique requise pour une bonne efficacité d'un siARN contre un virus contient une base guanine (G) à la position deux, un uracile (U) à la position dix, un G à la position 11 et l'absence de G à la position 13 (Servan de Almeida et al., 2008). Il est également nécessaire d'éviter les séquences palindromiques afin de prévenir tout repliement intra-moléculaire et diminuer la probabilité d'effets non spécifiques (Reynolds et al., 2004).

Depuis quelques années, plusieurs algorithmes de sélection de siARNs basés sur certaines de ces règles ont été conçus (Amarzguoui & Prydz, 2004 ; Levenkova et al., 2004 ; Patzel et al., 2005 ; Yiu et al., 2005). Leur principal but est d'augmenter le taux de succès des approches ARN interférents. Ces outils ont prouvé leur efficacité en certaines circonstances, mais ont échoué dans beaucoup d'autres cas (Servan de Almeida et al., 2008). Or, l'enjeu de cette sélection est important. L'utilisation de séquences de siARNs très

efficaces permet de diminuer les quantités de siARNs utilisées, ce qui réduit le risque d'effet hors-cible, la toxicité pour les cellules et le coût des réactifs. Ceci permet également l'utilisation de différents siARNs dirigés contre différents gènes, dans une même application.

#### 2.2.4 Applications de l'interférence ARN

Les siARNs font l'objet d'un usage intensif à l'heure actuelle pour étudier la fonctionnalité de gènes par inhibition de leur expression. Avec l'utilisation des siARNs, il est possible d'inactiver le fonctionnement d'un gène choisi avec une remarquable spécificité et d'évaluer son implication fonctionnelle dans un processus physiologique ou pathologique. Les chercheurs disposent donc d'un outil extrêmement puissant pour déterminer la fonction des gènes par l'analyse au niveau cellulaire de l'impact de leur extinction. De ce fait, des publications font état de l'analyse par ARNi de la quasi totalité des 19 000 gènes de *C. elegans* (Kamath et al., 2003), ce qui démontre l'énorme potentiel de cette technique.

Un autre aspect intéressant de l'interférence ARN est celui de l'inhibition incomplète de l'expression génique. En fait, ce caractère partiel de l'inhibition peut aussi constituer un des points forts de cette approche en permettant d'analyser la fonction de gènes essentiels et, de manière plus générale, d'étudier la relation entre le niveau d'expression et la physiopathologie des gènes impliqués dans des maladies (Hemann et al., 2003). L'interférence ARN permet donc d'aborder les régulations génétiques.

L'intérêt de cet outil réside également dans son utilisation thérapeutique potentielle. Le développement de médicaments basés sur des siARNs est une voie prometteuse en pharmacologie. La technologie siARN visant les gènes viraux ou cellulaires pourrait être une solution thérapeutique pour des maladies contre lesquelles ni vaccin, ni traitement ne sont actuellement disponibles (Colbère-Garapin et al., 2005). Des essais de traitements d'infections virales, de cancers, de maladies auto-immunes et neurodégénératives sont en cours (Manjunath et al., 2006 ; Castanotto & Rossi, 2009). Certains résultats ont déjà abouti à des essais cliniques de phase I et II (selon les données issues de l'U.S. National Institute of Health, <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=siRNA>). Ces essais incluent des maladies comme la dégénération rétinienne, les maladies génétiques du cerveau et de la peau, les désordres respiratoires, le cancer, les maladies métaboliques et certaines infections virales. Toutefois, l'usage thérapeutique de ces molécules interférentes à large échelle dépendra de



plusieurs conditions : absence de toxicité, spécificité des effets de *silencing* et efficacité de la délivrance *in vivo* (Ichim et al., 2004).

#### 2.2.5 L'interférence ARN comme lutte antivirale

L'interférence ARN semble être un mécanisme ancien de défense antivirale chez les mammifères. L'inhibition de la réplication virale a été démontrée pour la première fois par Bitko and Barik (2001) avec le virus respiratoire syncytial. Depuis, son efficacité a été démontrée *in vitro* pour une large variété de virus, incluant des virus à ARN tels que le HIV (Boden et al., 2003 ; Das et al., 2004 ; Sabariego et al., 2006 ; Schopman et al., 2010), les coronavirus (McDonagh et al., 2011), l'influenza virus (Ge et al., 2003 ; Seth et al., 2010 ; Zhiqiang et al., 2010), les morbillivirus (Otaki et al., 2006 ; Reuter et al., 2006 ; Servan de Almeida et al., 2007 ; Keita et al., 2008), les poliovirus (Gitlin et al., 2005 ; Saulnier et al., 2005) ou le virus de la fièvre aphteuse (Chen et al., 2006), mais aussi des virus à ADN comme les papillomavirus (Chen et al., 2010), le virus de la peste porcine africaine (Keita et al., 2010) et les herpes virus (Bhuyan et al., 2004 ; Wiebusch et al., 2004 ; Chen et al., 2008). Le mécanisme d'ARNi s'est également révélé efficace pour inhiber les virus des hépatites A, B, C et E (Radhakrishnan et al., 2004 ; Kanda et al., 2004 ; Wilson & Richardson, 2005 ; Sheldon & Soriano, 2008 ; Kumar et al., 2010). Bien que la plupart de ces études aient été réalisées *in vitro*, des résultats prometteurs ont été obtenus pour inhiber la multiplication virale *in vivo*, notamment en ce qui concerne le virus de l'hépatite B (Giladi et al., 2003), l'influenza virus (Tompkins et al., 2004) ou d'autres virus respiratoires (Bitko et al., 2005). A ce jour, plusieurs essais cliniques sont en cours chez l'homme (Tableau 5).

**Tableau 5. Les essais cliniques de thérapie antivirale basés sur l'ARNi (d'après Davidson & McCray Jr., 2011).**

Médicament	Virus	Cible	Laboratoire	Statut
SPC3649	VHC	miR-122	Santaris Pharm	En cours, phase II
pHIV7-shl-TAR-CCR5RZ	HIV	HIV Tat protein, HIV TAR RNA, human CCR5	City of Hope Mediacal Center/Benitec	Terminé, phase 0
ALN-RSV01	RSV en volontaires	RSV nucléocapside	Alnylam Pharm.	Terminé, phase II
ALN-RSV01	RSV en patients transplantés des poumons	RSV nucléocapside	Alnylam Pharm.	Terminé, phase I
ALN-RSV01	RSV en patients transplantés des poumons	RSV nucléocapside	Alnylam Pharm.	En cours, phase II

VHC, virus de l'hépatite C ; HIV, virus de l'immunodéficience humaine ; RSV, virus respiratoire syncytial.

## 2.2.6 Les difficultés à surmonter dans l'utilisation de l'interférence ARN

L'ARNi est un mécanisme qui présente des contraintes susceptibles d'affecter son efficacité. Certaines de ces contraintes sont décrites ici.

### 2.2.6.1 Les réponses interféron

Pour utiliser l'ARNi *in vivo*, il faut s'assurer que les siARNs n'activent pas une réponse immunitaire dans l'organisme de l'hôte. Initialement les chercheurs pensaient que seuls les ARNdb d'une longueur de plus de 30 pb pouvaient provoquer une réponse interféron en activant la protéine PKR et par conséquent interrompre l'ensemble de l'expression génique. Toutefois, il est apparu que les récepteurs TLR, pouvaient également reconnaître des motifs homologues à ceux des séquences ADN immunostimulantes dans les

siARN et déclencher une réponse interféron (Robbins & Rossi, 2005). Des recherches supplémentaires sont nécessaires afin de comprendre pleinement ces réactions immunitaires et les éviter lorsqu'on active un mécanisme d'ARNi.

#### 2.2.6.2 Effet hors-cible (*off-targets*) des siARNs

Des effets hors-cible non désirés peuvent survenir lorsque la séquence du brin guide d'un siARN transfecté ou d'un miARN exprimé comporte une certaine complémentarité avec la région 3' non traduite d'un ARNm qui n'était pas volontairement ciblé. Dans de tels cas, l'expression de cet ARNm peut être inhibée de manière significative (Birmingham et al., 2006 ; Jackson et al., 2006).

#### 2.2.6.3 Suppresseurs viraux de l'ARNi

Les parasites confrontés à un mécanisme de défense déploient un mécanisme de contre-défense. Les virus n'échappent pas à cette règle et peuvent utiliser des miARN de la cellule hôte pour augmenter leur propre réplication (Boyd, 2008) ou alors, produire des protéines supprimant des étapes variées de la voie de l'ARNi (Tableau 6). Normalement ces protéines, parfois multifonctionnelles, sont des facteurs de pathogénicité. Une grande variété de supresseurs viraux a été caractérisée, surtout chez les virus des plantes, révélant des mécanismes sophistiqués de contre-stratégie virale (Kasschau & Carrington, 1998 ; Qu & Morris, 2005). Dans ce contexte, il a été signalé récemment que la protéine Tat du HIV-1 fonctionne comme dispositif antagoniste à l'ARNi à travers l'inhibition du clivage des ARNdb en siARNs par le DICER (Bennasser et al., 2005). La protéine NS1 du virus de la grippe agit également en tant que facteur de virulence en augmentant l'expression des gènes viraux et en diminuant les défenses antivirales cellulaires. Elle favorise l'exportation nucléaire des ARNm viraux et retarde l'exportation des pré-miARNs (précurseurs des miARNs) cellulaires (Chen & Krug, 2000). D'autres virus possèdent également des protéines suppressives (Tableau 6).

**Tableau 6. Suppresseurs viraux de l'ARNi.**

<b>microARN ou protéine viral</b>	<b>Virus</b>	<b>Fonction</b>	<b>Référence</b>
miR-UL112	Cytomégalo virus	Inhibe la protéine hôte MICB induisant une résistance à l'action des lymphocytes NK	Stern-Ginossar et al., 2009
miR-K12-11	Herpès virus du Sarcome de Kaposi	Action sur des nombreux ARN impliqués dans l'apoptose et la réponse immunitaire innée	Gottwein et al., 2007 ; Skalsky et al., 2007
miR-BART2	Virus d'Epstein-Barr	Clivage du transcrit viral BALF5 qui code pour la polymérase virale	Pfeffer et al., 2004
miR-S1	Virus Simien 40	Clivage des transcrits précoces au cours du stade tardif d'infection, réduisant ainsi le taux de protéines T	Sullivan et al., 2005
miR-LAT	Herpès simplex type 1	Inhibition de l'apoptose à travers la modulation de TGF- $\beta$	Gupta et al., 2006
Protéine Tat	virus de l'immunodéficience humaine	Inhibition du clivage des ARNdb en siARNs par DICER	Bennasser et al., 2005
Protéine NS1	Virus de l'influenza A humaine	Favorise l'exportation nucléaire de l'ARNm viral et retarde l'exportation des pre-miARNs cellulaires	Chen & Krug, 2000
Protéine du <i>core</i>	Hépatite C	Inhibition du clivage des ARNdb en siARNs par DICER	Wang et al., 2006
Protéine d'enveloppe (E2)	Hépatite C	Intéragit avec l'argonaute 2 (sous-unité catalytique du mécanisme ARNi) et le rend inactif	Ji et al., 2008
Protéine VP35	Virus de l'Ebola	Séquestration de si- et miARNs	Haasnoot et al., 2007
Protéine E3L	Virus de la vaccine	Séquestration de si- et miARNs	Li et al., 2004
Protéine NSs	La Crosse virus	Séquestration de si- et miARNs	Soldan et al., 2005

Par ailleurs, de nombreux virus expriment des ARNs non codant (miARNs) et utilisent la machinerie de l'interférence ARN pour exercer leur action sur la cellule hôte (Gupta et al., 2006 ; Sullivan, 2008), en particulier pour contrôler le système immunitaire (Sarnow et al., 2006 ; Nelson, 2007). Plusieurs exemples de miARNs viraux peuvent

illustrer ce phénomène d'évasion comme le virus Epstein-Barr (EBV) qui possède dans son génome deux régions (clusters) codant des miARNs dont les cibles prédites sont des gènes de la cellule-hôte impliqués dans la prolifération cellulaire, l'apoptose et les signaux immunitaires (Pfeffer et al., 2005). Des études ont ainsi démontré que des miARN du virus EBV ciblaient l'oncogène viral LMP1 et stimulaient son expression, favorisant ainsi la transformation cellulaire (Lee & Dutta, 2009). Des nombreux autres virus possèdent des gènes codant des miARNs tels que le cytomégalo virus (CMV), le virus simien 40 (SV40), et l'Epstein-Barr (Tableau 6).

#### 2.2.6.4 Saturation des composants de la voie endogène de l'ARNi

Il a été récemment démontré qu'une expression excessive de shARN pouvait être toxique et fatale pour les souris. Cette toxicité était due à une saturation de la machinerie d'interférence ARN et s'est avérée létale pour des souris dans lesquelles les shARN avaient été exprimés (Grimm et al., 2006). De plus, une expression plus faible de shARN dans des lymphocytes primaires humains semble supprimer l'effet toxique des mêmes shARN tout en conservant un effet interférent (An et al., 2006). Il est donc clair, que l'optimisation des niveaux d'expression des shARNs est nécessaire avant toute application thérapeutique.

#### 2.2.6.5 La délivrance *in vivo*

Depuis la découverte des ARNs interférents, de nombreux efforts ont été accomplis pour une utilisation en recherche et en clinique. Les petits ARNs interférents présentent néanmoins des caractéristiques physicochimiques et une vulnérabilité aux attaques de l'environnement comme les dégradations enzymatiques, rendant difficile leur incorporation à l'état fonctionnel dans le cytoplasme des cellules cibles où se situe le complexe protéique RISC. En outre, leur charge négative, leur caractéristique hydrophile et leur poids moléculaire constituent de véritables obstacles au passage de la membrane plasmique. Le protocole de transfection cellulaire de siARNs ou de plasmides exprimant de shARNs développé à l'origine est basé sur l'utilisation de liposomes. L'efficacité de transfection est approximativement de 90% mais malheureusement elle reste très chère et trop toxique pour une utilisation directe *in vivo* (Surowiak, 2003). C'est pourquoi, d'autres méthodes sont en

train d'être développées pour introduire des siARN dans les cellules. Il existe actuellement deux grandes méthodes pour déclencher l'ARNi *in vivo* : l'administration directe de siARNs, ou l'administration de vecteurs viraux et non viraux qui expriment des shRNAs qui seront par la suite transformés en siARNs actifs. Les véhicules non viraux présentent moins de soucis de sûreté que les vecteurs viraux, mais sont généralement moins efficaces pour la délivrance (Colbère-Garapin et al., 2005).

L'administration directe de siARN a été réalisée pour la première fois par l'équipe de McCaffrey, en injectant un volume de 1,8 ml de tampon phosphate PBS (*phosphate buffered saline*) en cinq à sept secondes contenant des siARN et un plasmide d'expression contenant le gène de la luciférase dans le foie chez la souris (McCaffrey et al., 2002). Les auteurs ont ainsi réussi à inhiber 81% de l'expression de la luciférase. Cependant, cette méthode ne peut pas être médicalement viable en raison des dommages potentiels au foie. Un autre succès de l'administration directe de siARN est venu de l'administration locale dans l'œil. Un siARN spécifique du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor, un facteur de croissance spécifique des cellules endothéliales), a été délivré dans l'espace sous rétinien chez des souris. Il a permis une réduction d'environ 75% de l'angiogenèse au niveau de l'œil (Reich et al., 2003). Dans ce modèle, il n'a pas été nécessaire de modifier le siARN, ou de le complexer avec un polymère lipidique ou un autre agent de transfection, comme c'est le cas dans d'autres systèmes (Reich et al., 2003). Cependant, l'usage des siARNs *in vivo* reste restreint et probablement handicapé par leurs dégradations rapides par des ARNases présentes dans le sérum et/ou par leur rapide élimination de l'organisme. Des siARN administrés par voie systémique chez la souris s'accumulent dans le foie et les reins, et après à peine cinq minutes, ils sont retrouvés dans les urines (Braasch et al., 2004).

Utilisés depuis plus de 20 ans dans le cadre de la thérapie génique, les vecteurs viraux ont récemment été appliqués à l'interférence ARN afin de délivrer aux cellules des plasmides d'expression d'ARNs interférents. Le recours à des virus pour transporter des acides nucléiques repose sur le constat d'efficacité de ceux-ci à transférer leur propre matériel génétique dans les cellules humaines (Dallas & Vlassov, 2006) et sur le fait qu'on peut modifier leur génome pour porter des séquences étrangères dont celles exprimant les ARN interférents d'intérêt. Les vecteurs viraux sont des systèmes de délivrance très efficaces, mais leur application clinique est freinée par un certain nombre d'inconvénients (Thomas et al., 2003). Ils peuvent induire des réponses immunitaires et/ou s'intégrer de façon aléatoire dans le génome hôte. De plus, leur production en conditions industrielles peut s'avérer relativement complexe et coûteuse. S'ils sont répliatifs, la question de leur

biosécurité doit être posée. Néanmoins, un certain nombre d'approches virales ont été étudiées *in vivo*. Elles concernent principalement des vecteurs viraux construits pour exprimer notamment des ARN en épingle à cheveux (Xia et al., 2002 ; Hacein-Bey-Abina et al., 2003 ; Ong et al., 2005 ; Singer et al., 2005). Les vecteurs viraux les plus utilisés actuellement pour la délivrance *in vivo* des shARNs sont les adénovirus, les virus associés à l'adénovirus (AAV), les lentivirus, les rétrovirus et les baculovirus. Les rétrovirus ont été parmi les premiers vecteurs utilisés pour transfecter des cellules avec des ARN en épingle à cheveux, mais ils ont des inconvénients pour être appliqués *in vivo*. En effet, trois patients d'un essai clinique de thérapie génique utilisant ces rétrovirus pour traiter le syndrome d'immunodéficience sévère lié au chromosome X ont développé des leucémies (Fisher et al., 1999). Les rétrovirus sont des virus à ARN. Après internalisation nucléaire de l'ARN rétroviral, celui-ci est rétrotranscrit en ADN et est ensuite intégré dans le génome de l'hôte, d'où son intérêt comme vecteur dans le transfert de gènes (Zhang & Godbey, 2006). Leur insertion permet leur transmission à la descendance mais se fait de façon aléatoire, d'où la possibilité d'engendrer des mutations. Les lentivirus font partie d'une sous-classe de rétrovirus. Même s'il existe des problèmes de sécurité d'emploi, les lentivirus sont attrayants en tant que vecteurs de transfection. Ils présentent peu de risque d'insertion mutagène et sont capables de transfecter efficacement des cellules primaires et des cellules quiescentes. De plus, les lentivirus peuvent incorporer de grandes quantités de matériel génétique et ne sont que faiblement immunogènes (Trono, 2000). Les adénovirus sont des virus à ADN linéaire. Le génome viral n'a pas la capacité de s'intégrer dans celui de l'hôte et reste épisomal dans le noyau, tout en utilisant les machineries enzymatiques. Son expression est par conséquent transitoire et faible, ce qui n'est pas un avantage pour le traitement des maladies chroniques. Les vecteurs adénoviraux exprimant des ARN en épingle à cheveux ont été utilisés *in vivo* avec des résultats prometteurs contre les infections virales. Chen et al. (2006) ont réussi à protéger des cobayes et des porcs contre l'infection par le virus de la fièvre aphteuse. De la même façon, les vecteurs adénoviraux ont été utilisés pour protéger les souris contre le circovirus porcin de type 2 (Feng et al., 2008). Malgré la démonstration de leur efficacité *in vivo* sur l'animal, les adénovirus provoquent toujours des réponses inflammatoires et leur toxicité, surtout au niveau du foie, est problématique (Palmer & Ng, 2005). L'AAV semblait être très prometteur pour la délivrance de l'ARNi *in vivo* puisqu'il a longtemps été considéré comme inoffensif (Carter, 2005). Cependant, le décès d'un patient dans un essai clinique de traitement de la polyarthrite rhumatoïde, par des vecteurs dérivés de l'AAV a soulevé de gros doutes sur l'utilisation de ce type de vecteurs (Hughes, 2007). Les baculovirus

présentent l'avantage de pouvoir contenir des grandes quantités d'informations géniques et sont incapables de se répliquer et d'exprimer des protéines virales dans les cellules de mammifères (Kost & Condreay, 2002). D'un autre côté, la délivrance à des cellules et des tissus spécifiques et le problème de leur inactivation par le complément restent des soucis majeurs à résoudre pour leur utilisation *in vivo* (Hofmann & Strauss, 1998).

Une autre approche pour la délivrance de siRNA consiste à utiliser des vecteurs non viraux pour essayer d'améliorer la pharmacocinétique et la délivrance des siARNs. On retrouve notamment les lipides cationiques, les polymères cationiques et les peptides de pénétration cellulaire. Le point commun de tous ces vecteurs est leur charge positive, qui facilite à la fois la formation de complexes avec les acides nucléiques polyanioniques, et l'interaction avec les membranes cellulaires chargées négativement. Bien que les mécanismes exacts de délivrance soient divers, ces complexes et particules ont en commun de protéger les siRNA dans leur circulation dans le sang périphérique, d'éviter leur accumulation dans le système réticulo-endothélial et d'atteindre les cellules cibles. Ils peuvent permettre également d'altérer leurs propriétés pharmacocinétiques, en prolongeant leur demi-vie *in vivo* et de former des structures de taille supérieure à la limite de filtration rénale (Trehan et al., 2010). Il est toutefois à noter que les systèmes de transfection cationiques (notamment les lipides) peuvent promouvoir des effets non spécifiques des siARN et également leur capacité à induire une stimulation du système immunitaire (Judge et al., 2005 ; Ma et al., 2005). La sélection inappropriée d'un vecteur de transfection peut ainsi diminuer l'activité biologique d'inhibition du gène cible, tout en provoquant des effets secondaires indésirables (Trehan et al., 2010). L'efficacité de ces systèmes peut enfin être limitée *in vivo* en raison de phénomènes d'agrégation avec les facteurs circulants du sang périphérique ou d'une fixation à la matrice extracellulaire (Trehan et al., 2010 ; Rao, 2010).

Bien qu'il soit encore tôt pour tirer des conclusions sur les techniques de délivrance *in vivo*, on peut observer des résultats assez encourageants avec l'administration des siARN au niveau local, ou bien par voie systémique. Ces résultats laissent présager de l'essor que prendra l'interférence en thérapeutique clinique dans les années à venir.

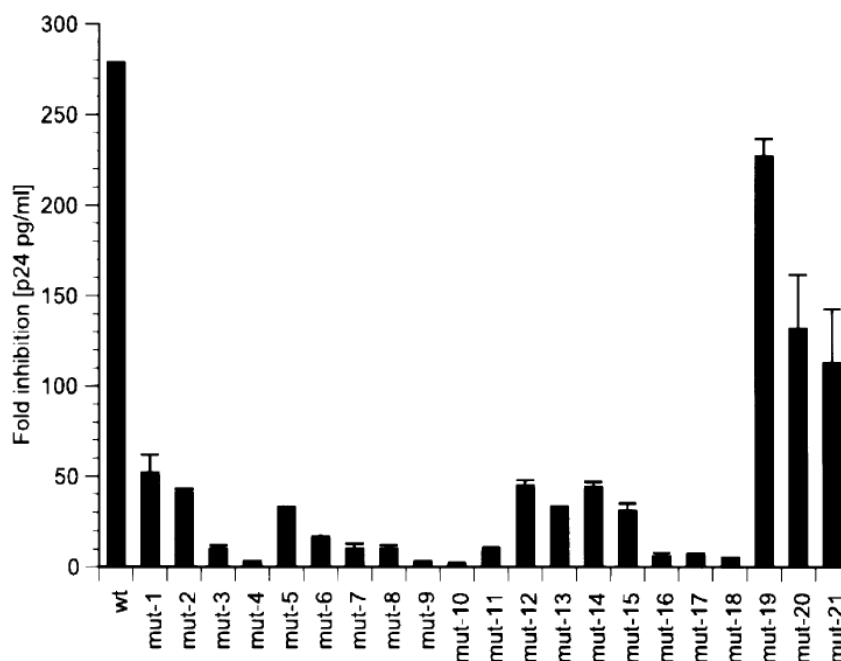
#### 2.2.6.6 Emergence des virus d'échappement

Un des plus grands risques liés à l'utilisation de thérapies antivirales, quelles qu'elles soient, est l'émergence de résistances (Gitlin et al., 2005). Bien que l'ARNi soit considérée



comme une stratégie prometteuse pour combattre une large variété de virus, l'échappement au traitement transitoire par des siARNs a été plusieurs fois décrit, notamment avec les virus à ARN (Boden et al., 2003 ; Das et al., 2004 ; Gitlin et al., 2005 ; Westerhout et al., 2005 ; Wilson & Richardson, 2005 ; Wu et al., 2005 ; Konishi et al., 2006 ; Kusov et al., 2006 ; Nishitsuji et al., 2006 ; Sabariego et al., 2006 ; ter Brake et al., 2006 ; Unwalla et al., 2006 ; Baba et al., 2008 ; von Eije et al., 2008).

La résistance contre les séquences de siARN inhibitrices peut se produire par une mutation simple dans ou en dehors de la région cible (Gitlin et al., 2005 ; Westerhout et al., 2005 ; von Eije et al., 2008) ou une délétion partielle ou complète (Westerhout et al., 2005). Toutes ses mutations ou délétions peuvent soit empêcher la reconnaissance de la région cible par le siARN (mutation dans la région cible), soit produire une modification de la structure secondaire de l'ARN et réduire l'accessibilité de la zone de clivage (mutation en dehors de la région cible ; Bohula et al., 2003 ; Far & Sczakiel, 2003 ; Luo & Chang, 2004 ; von Eije et al., 2008). En effet, Westerhout et al. (2005) ont démontré une forte corrélation entre la stabilité du duplex des siARN/ARN-cible liée au degré de complémentarité des séquences et le niveau de résistance à l'ARNi. Les mêmes auteurs ont observé l'échappement du HIV-1 aux siARNs par des mutations en dehors de la région cible mais qui ont induit une structure secondaire alternative de l'ARNm réduisant l'accessibilité de la zone cible. Comme indiqué précédemment, toute mutation ou délétion n'a pas le même impact sur l'interférence ARN. Il a été démontré qu'en fonction de la localisation de la mutation dans la zone cible, une inhibition plus ou moins importante est observée (Pusch et al., 2003). Ainsi, les mutations dans la région centrale de la cible peuvent être responsables d'une perte totale d'efficacité des siARN, alors que les mutations à l'extrémité 5' entraînent une perte partielle et les mutations à l'extrémité 3' sont sans effet (Figure 18 ; Pusch et al., 2003 ; Gitlin et al., 2005 ; Sabariego et al., 2006).



**Figure 18.** Niveau de perte d'inhibition de l'interférence ARN après mutation de chaque nucléotide de la séquence cible (d'après Pusch et al., 2003).

Plusieurs virus sont capables d'échapper très rapidement au traitement avec un siARN, comme le démontrent les travaux de Gitlin et al. (2005) sur les poliovirus et de Wilson et Richardson (2005) sur le virus de l'hépatite C. Cependant, c'est avec le HIV-1, que des événements d'échappement aux traitements antiviraux, dont l'ARNi, ont été décrits à maintes reprises. En effet, des mutants d'échappement de ce virus peuvent apparaître après seulement quelques jours de traitement (Boden et al., 2003 ; Das et al., 2004 ; von Eije et al., 2008).

Le niveau d'échappement semble être directement lié à la quantité de points de mutation dans la région cible. En effet, Wilson et Richardson (2005) ont montré qu'un mutant d'échappement avec une seule mutation pouvait avoir une résistance de seulement 4 à 13% à l'ARNi, mais que ce niveau de résistance augmentait à 70-80% avec un deuxième point de mutation. Le traitement répété avec le même siARN favorise la sélection de mutations multiples dans la séquence cible, menant à un niveau plus élevé de résistance au ARNi (Gitlin et al., 2005 ; Wilson & Richardson, 2005). En conséquence, le traitement combiné avec plusieurs siARNs est plus efficace à la fois dans l'inhibition de la réplication des virus (Kanda et al., 2004) et dans la prévention de l'émergence de mutants résistants (Wilson & Richardson, 2005 ; ter Brake et al., 2006).

Les délétions d'une partie de la zone cible peuvent être un recours adopté par certains virus pour échapper à l'ARNi. Cependant, cette voie d'échappement semble être

limitée aux gènes viraux non-structuraux dans la mesure où elle peut impacter sur la fonctionnalité des protéines concernées et la viabilité des virus (von Eije et al., 2008).

Comme on a pu le constater, plusieurs virus ont de forte propension à générer des mutants d'échappement. Différentes stratégies peuvent être adoptées pour empêcher l'apparition de résistance contre l'ARNi telles que : (i) l'expression de la séquence inhibitrice dans un format d'épingle à cheveux (ter Brake et al., 2006) qui pourra être produite par des cassettes d'expression insérées dans des plasmides transférés dans le cytoplasme cellulaire ou dans des vecteurs viraux pour produire de nombreuses copies de shARN et donc de molécules de siARN endogènes ; (ii) l'association de plusieurs siARNs (Gitlin et al., 2005 ; Gimenez-Barcons et al., 2007). Une autre voie consiste à cibler un gène viral essentiel et très conservé entre virus d'une même famille. En effet, cette conservation peut signifier la présence d'un motif structurel ou fonctionnel indispensable, créant ainsi une pression de sélection négative forte qui limite la capacité de dérive génétique du virus. D'autres moyens plus récents mais plus complexes consistent à utiliser, comme cibles, des co-facteurs cellulaires de la réplication virale (Eekels et al., 2011) ou à anticiper toutes les possibilités d'échappement d'une région cible donnée et de délivrer un cocktail de siARNs qui couvrent toutes ces possibilités (Schopman et al., 2010).

### 3 PROBLEMATIQUE ET OBJETIF

Pour inhiber la réplication des morbillivirus, le Cirad a mis au point une stratégie antivirale basée sur l'interférence ARN dans l'objectif final de développer un vaccin thérapeutique anti-morbillivirus. Trois siARNs (siNPPRV1, siNPPRV6 et siNPPRV7) synthétiques ciblant le gène de la nucléoprotéine virale ont été identifiés comme étant capables d'empêcher la réplication *in vitro* du virus de la peste de petits ruminants, de la peste bovine et de la rougeole (Servan de Almeida et al., 2007 ; Keita et al., 2008). Cependant, compte tenu de la plasticité des génomes des virus à ARN, l'exposition continue de morbillivirus aux siARN pourrait donner lieu à des mutants viraux capables d'échapper à l'interférence ARN.

L'objectif de ce travail de recherche est d'évaluer la capacité d'apparition de virus mutants d'échappement d'un morbillivirus (le virus de la peste des petits ruminants a été choisi comme modèle) sous pression de sélection de siARNs préalablement identifiés par le Cirad. Tout d'abord, le virus a été soumis à chaque siARN pris séparément ou en association par deux ou trois. Dans un second temps, nous avons vérifié que les mutations ou les délétions observées étaient bien directement responsables de l'échappement. Cette étude est considérée comme un préalable indispensable à l'optimisation d'une stratégie thérapeutique anti-morbillivirus.

## 4 MATERIELS ET METHODES

### 4.1 Cellules, virus, et siARNs

Les cellules Vero ont été obtenues de la collection européenne de culture cellulaire (ECACC, de l'anglais European Collection of Cell Culture, France, 84113001). Elles ont été cultivées en milieu essentiel de Eagle (MEM, Invitrogen, Fischer Scientific, France) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Dutcher, France) et 2 mM de L-glutamine (Invitrogen, Fischer scientifique, France). Elles ont été maintenues dans un incubateur humidifié à 37 °C avec 5% de CO<sub>2</sub>.

Les stocks de virus de travail sont obtenus après infection de cellules Vero cultivées en boîte de 25 ou 75 cm<sup>2</sup> dans du MEM à 5% de SVF et 2 mM de L-glutamine. Après chaque infection virale, les cellules sont observées quotidiennement au microscope inversé. Quand l'effet cytopathique (ECP) atteint environ 80% des cellules, soit trois à cinq jours post-infection, les cellules sont soumises à trois cycles de congélation/décongélation. Les aliquots de virus sont stockés à -80 °C.

Les titrages sont réalisés en plaques de 96 puits dans lesquelles 100 µL de suspensions virales diluées au dixième ( $10^{-1}$  à  $10^{-7}$ ) dans du milieu MEM ont été mis en contact avec 100 µL d'une suspension contenant 20 000 cellules Vero/puits en MEM avec 2 mM de L-glutamine et 10% de SVF. Pour chaque dilution virale, dix puits ont été ensemencés. Les titres viraux ont été estimés dix jours après par la méthode de Reed et Muench (1983). Ils sont exprimés en dose infectant 50% des cultures cellulaires (DICC50/ml).

Pour la synthèse et la purification des siARNs nous avons fait appel au fournisseur commercial Applied Biosystems (France, ≥ 80% de pureté). Trois siARNs (siNPPRV1, siNPPRV6 et siNPPRV7, Tableau 7) ciblant une région hautement conservée entre morbillivirus (région III, 85-90% de conservation) et codant pour la nucléoprotéine virale ont été utilisés. Deux autres siARNs (siNPPRV1mut1 et siNPPRV1mut4) spécifiques des mutants d'échappement et un siARN de contrôle (siMPPRV11), ciblant le gène de la protéine de matrice du virus de la PPR, ont également été utilisés (Tableau 7).

**Tableau 7. siARNs utilisés dans ce travail.**

<b>siARN</b>	<b>Séquence du brin sense (5' – 3')</b>	<b>Position dans l'ARNm</b>
<b>siNPPRV1</b>	GGAUCAACUGGUUUGAGAA <sub>tt</sub>	480-498
<b>siNPPRV6</b>	GGCGGUUCAUGGUAUCUCU <sub>tt</sub>	741-759
<b>siNPPRV7</b>	GCAUUAGGCCUUCACGAGU <sub>tt</sub>	899-917
<b>siNPPRV1mut1</b>	GGAUCGGCUGGUUUGAGAA <sub>tt</sub>	480-498
<b>siNPPRV1mut4</b>	GGAUCAGCUGGUUUGAGAA <sub>tt</sub>	480-498
<b>siMPPRV11 (siARN contrôle)</b>	GGUAUUUUACAACAACACU <sub>tt</sub>	366-384

## **4.2 Transfection des siARNs et infection virale**

Pour la transfection, les cellules Vero sont préparées comme suit. Après trypsination, les cellules sont remises en suspension dans du milieu (MEM à 10% SVF et 2mM L – glutamine) et réparties en plaque de 48 puits, à raison de 50 000 cellules par puits. Les plaques sont incubées à 37 °C en présence de 5% de CO<sub>2</sub>. Vingt-quatre heures plus tard, le milieu MEM est remplacé par 100 µl par puits de MEM sans sérum. Les siARNs, complexés, dans un volume total de 50 µl d'OptiMEM (Invitrogen, Fischer scientifique, France) à 1 µg de lipofectamine sont ajoutés dans chacun des puits après 20 minutes d'incubation à température ambiante. Plusieurs concentrations (100 ; 33,3 ; 11,1 ; 3,7, et 0 nM) et combinaisons (seul, par paire ou par triplet) de siARN sont testées et ont été choisies basés sur les résultats obtenus auparavant par l'équipe (Servan de Almeida et al., 2007 ; Keita et al., 2008). Le plan de plaque est représenté dans la Figure 19. Les plaques sont ensuite incubées pendant quatre à six heures à 37 °C en présence de 5% de CO<sub>2</sub>. Après incubation, 350 µl de MEM à 5% de SVF et 2 mM de L-glutamine sont ajoutés au surnageant de culture cellulaire et les plaques remises à nouveau dans l'incubateur.

	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
<b>CC</b>							
<b>0 nM</b>							
<b>3,7 nM</b>							
<b>11,1 nM</b>							
<b>33,3 nM</b>							
<b>100 nM</b>							

**Figure 19. Schéma d'une plaque de transfection.** Dans les colonnes les dilutions du virus et dans les lignes, les dilutions des siARNs. CC, contrôle de cellules Vero transfectées avec les siARNs mais pas infectées.

Vingt-quatre heures après transfection, le surnageant des cellules est remplacé par 200  $\mu$ L du milieu MEM complet et 200  $\mu$ L de suspension virale collectée à la transfection précédente et pré-diluée au dixième dans du milieu MEM sans SVF (Figure 19). En parallèle, les suspensions virales prélevées à la transfection précédente sont titrées pour déterminer la MOI (Multiplicité d'infection, du anglais *Multiplicity of Infection*) dans chaque puits de la plaque de transfection.

Quatre à cinq jours plus tard, la réduction de l'ECP par les siARNs a été évaluée au microscope inversé. Un score selon la quantité d'ECP observée a été attribué : (-) pour 0% d'ECP, (+) pour un ECP entre 1% et 25%, (++) pour un ECP entre 26% et 50%, (+++) pour un ECP entre 51% et 75%, (+++++) pour un ECP entre 76% et 99%, et (+++++) pour 100% d'ECP.

A la fin de chaque cycle de transfection/infection, les virus sont collectés dans les puits ayant au moins 25% (+) d'ECP. Ils sont mélangés, congelés/décongelés trois fois et stockés à -80 °C pour être utilisés dans la transfection suivante.

### 4.3 Immunofluorescence (IF)

Le test d'immunofluorescence est utilisé pour mettre en évidence la différence de degré d'ECP entre le virus sauvage et un virus d'échappement généré après transfections successives avec le siNPPRV1. Pour cela, des cellules Vero transfectées et infectées selon la

méthode décrite ci-dessus sont lavées trois fois en tampon phosphate PBS puis fixées avec du paraformaldehyde à 3% pendant 20 minutes à température ambiante. Après une deuxième étape de trois cycles de lavages en PBS, les cellules sont mises en contact avec 200 µl d'une dilution appropriée d'anticorps monoclonal (mAc)-couplé TRITC, spécifique du gène N du virus de la PPR. Les plaques sont incubées pendant 30 min à 4 °C et lavées trois fois avec le tampon PBS. La lecture est effectuée à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Eclipse TE300, Nikon).

#### **4.4 Evaluation de l'efficacité des siARNs (siNPPRV1, siNPPRV6 et siNPPRV7) face aux souches sauvages de PPRV disponibles au laboratoire de virologie du Cirad**

Dans des travaux précédents (Servan de Almeida et al., 2007 ; Keita et al., 2008) les siARNs NPPRV1, NPPRV6 et NPPRV7 ont une très bonne efficacité *in vitro* dans l'inhibition de la multiplication de la souche vaccinale du PPRV Nigéria 75/1. Cependant, aucune vérification de leurs effets sur les souches sauvages du PPRV n'avait été réalisée. Pour effectuer cette évaluation, les cellules Vero sont transfectées avec différents siARNs à une concentration de 0 ; 3,7 ; 11,1 ; 33,3 et 100 nM et infectées avec une dose de 0,1 MOI des différentes souches sauvages de PPRV disponibles dans le laboratoire de virologie du Cirad (Tableau). Le protocole est identique à celui décrit précédemment.

***Tableau 8. Souches de PPRV disponibles dans le laboratoire de virologie du Cirad.***

<b>Ligné</b>	<b>Souche</b>	<b>Origine</b>	<b>Année d'isolement</b>
I	ICV89	Côte d'Ivoire	1989
I	Burkina Faso/1988	Burkina Faso	1988
II	Nigéria/75/1 vaccinale	Nigéria	1975
II	Nigéria/75/1 sauvage	Nigéria	1975
III	Dorcas/1987	Oman	1987
III	Mielik/1972	Sudan	1972
IV	Marocco/2008	Maroc	2008
IV	India Pradesh/1995	India	1995



#### 4.5 Extraction de l'ARN total, RT-PCR et séquençage

L'ARN total est extrait du surnageant des cultures cellulaires avec le kit commercial NucleoSpin® (Macherey Nalgen, Hoerd, France) selon le protocole recommandé par le fabricant.

Afin de vérifier la séquence de la N des souches sauvages et la présence de mutations sur les virus d'échappement, la région de la nucléoprotéine virale entourant les cibles des trois siARNs est amplifiée par RT-PCR (reverse transcription-PCR) avec le kit commercial One Step RT-PCR (Qiagen, France) en utilisant les couples d'amorces suivants : sens NP63 5'-ACCGGCGTGATGATCAGCAT-3' et antisens NP4 5'-CCTCCTCCTGGTCCTCCAGAATCT-3'. La N entière est également vérifiée par son amplification par RT-PCR avec les amorces : sens N-leader 5'-ACCAGACAAAGCTGGGTAAG-3' et antisens PPG1946R 5'-GGACGTATCAGGGTTCGGTGTG-3'. Le produit d'amplification est envoyé au prestataire commercial GATC (Konstanz, Allemagne) pour le séquençage.

Les mutations sont visualisées par la présence d'un double pic dans les chromatogrammes : l'un d'entre eux représente le nucléotide original et l'autre le nucléotide muté. Selon le prestataire commercial GATC, la limite de détection au séquençage d'une population minoritaire est de 15-30%. L'apparition de la mutation est prise en compte une fois que le pic représentant le nucléotide muté dépasse celui représentant le nucléotide d'origine.

#### 4.6 High resolution melting real-time PCR (PCR-HRM)

La technique *high-resolution melting* real-time PCR (PCR-HRM) est une méthode d'analyse post-PCR employée pour identifier des variations dans les séquences d'acides nucléiques. La méthode est basée sur la détection de différences dans les courbes de dissociation, indiquent des différences dans les séquences nucléotidiques. Les molécules de fluorochrome intercalant sont insérées de manière contiguë au sein de la séquence d'ADN amplifié par PCR sans laisser d'espace libre et révèle donc la moindre mutation présente dans le gène ciblé par les amorces utilisées. Grâce au logiciel adapté (LightCycler® 480-Genotyping, sur le mode « *Gene scanning* », Roche), il est ainsi possible de différencier des gènes ayant des mutations ponctuelles, des insertions ou des délétions. L'HRM permet la

détection de ces anomalies avec une sensibilité très élevée. En outre, la quantification des acides nucléiques étant possible par cette méthode, on peut donc obtenir une information à la fois qualitative et quantitative.

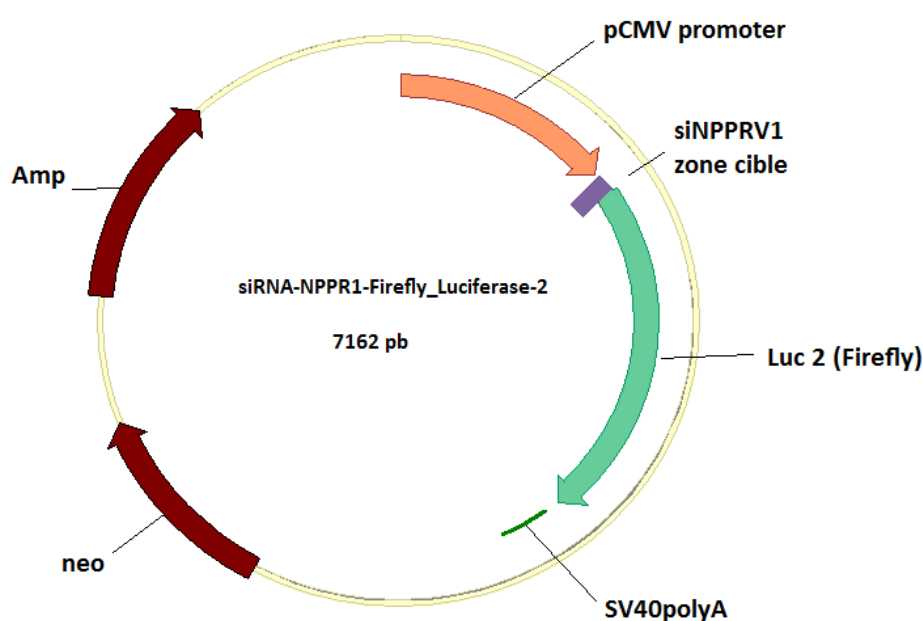
Dans cette étude, la PCR-HRM est utilisée dans le but de comprendre la cinétique d'apparition et de multiplication du virus mutant d'échappement si1mut3 par rapport au virus parental. Tout d'abord, les ARNs extraits du surnageant des transfections sont transcrits en ADNc (ADN complémentaire) selon les recommandations du fabricant du kit commercial first-strand DNAc synthesis kit (GE Healthcare, Dutscher, France).

Pour la PCR-HRM, les ADNc sont amplifiés avec les amorces sens si1(77pb) 5'-GGACCCTCGAGTGGAAGTAA-3' et antisens si1(77pb) 5'-GCATCTTGACCTCTATGTC-3' et le kit commercial LightCycler® 480 High Resolution Melting de Roche Applied Science (Mannheim, Germany), selon les recommandations du fabricant (1 X MasterMix, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de chaque primer). Les courbes de fusion des fragments amplifiés sont analysées par le logiciel LightCycler® 480-Genotyping sous le mode *Gene scanning*. Une courbe standard avec différents ratios de la population parentale/population mutée (100/0%, 75/25%, 50/50%, 25/75%, 0/100%) est utilisée comme référence pour la quantification du mélange de ces deux populations dans chaque transfection successive.

#### **4.7 Vérification du rôle des mutations/délétion dans la résistance à l'interférence ARN**

Des plasmides rapporteurs contenant le vecteur d'expression pCI-neo (Promega, France) et la zone cible du siNPPRV1 (original ou avec les différentes mutations et délétion détectées) en amont du gène de la luciférase ont été construits au laboratoire. Ces plasmides sont utilisés, associés aux siARNs mutés et non-mutés, pour vérifier que les mutations et la délétion trouvées sur les virus mutants sont bien directement responsables de l'échappement et non indirectement à l'origine d'un effet hors-cible (*off-target*). Pour ce fait, la séquence cible du siNPPRV1 parental présente dans le plasmide rapporteur (siRNA-NPPR1-Firefly\_Luciferase-2 ; Figure 20 ; Nizamani, 2010) est modifiée par mutagenèse dirigée en fonction des mutations et de la délétion rencontrées après sélection par le siNPPRV1. Pour l'introduction de ces modifications, le kit commercial QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Etats-Unis) est utilisé conformément aux recommandations du

fournisseur. Tout d'abord, le plasmide siRNA-NPPR1-Firefly\_Luciferase-2 est amplifié avec les amorces contenant les mutations ou la délétion (Tableau 9). Les produits amplifiés sont traités à l'endonucléase *Dpn* I puis utilisés pour transformer les bactéries ultracompetentes XL10-Gold (Stratagene, Etats-Unis) selon les instructions du fabricant. Les bactéries transformées sont cultivées en milieu LB agar (Invitrogen, Fischer scientifique, France) avec 1% d'ampicilline comme marqueur de sélection. Les plasmides produits sont purifiés avec le kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, Fischer Scientific, France) et séquencés par le prestataire commercial GATC (Konstanz, Allemagne) pour confirmation des mutations ou de la délétion désirées.



**Figure 20. Plasmide rapporteur siRNA-NPPR1-Firefly\_Luciferase-2 (Nizamani, 2010).** La séquence cible du siNPPRV1 est placée directement en amont de la séquence ARNm du gène de la Firefly Luciférase-2. L'expression est contrôlée par le promoteur du cytomégalo virus humain (pCMV).

**Tableau 9. Couples d'amorces utilisés pour l'introduction des mutations et de la délétion dans la zone cible du siNPPRV1 présente dans le plasmide rapporteur siRNA-NPPR1-Firefly\_Luciferase-2.**

Amorce	Séquence Sens (5'- 3')	Séquence antisens (5'- 3')
siNPPRV1-mut1	CGCCCTTGGATCGGCTGGTTTGAG	CTCAAACCGCCGATCCAAGGGCG
siNPPRV1-mut3	CGCCCTTGGATAAACTGGTTTGAG	CTCAAACCGATTTATCCAAGGGCG
siNPPRV1-mut4	CGCCCTTGGATCAGCTGGTTTGAG	CTCAAACCGCTGATCCAAGGGCG
siNPPRV1-del	CTCGAGAACGCCCTTAGAAAACTGGTTTGAG	CTCAAACCGTTTTCTAAGGGCGTTCTCGAG

La capacité d'expression de ces constructions et la capacité de différents siARNs (mutés et non-muté) à inhiber l'expression sont évaluée *in vitro* par co-transfection des cellules Vero avec 100 ng de chaque plasmide et 10 ng de chaque siARN complexé à 0,25 µl/puits de Lipofectamine 2000. Ces essais sont réalisés en plaques de 96 puits contenant 20 000 cellules Vero/puits selon la procédure de transfection décrite 4.2. L'activité *in vitro* de la luciférase est mesurée 48 heures post-transfection par bio-imagerie en utilisant l'appareil IVIS-Lumina II (Caliper Life Sciences, France) après addition de 150 µg/µl du sel de potassium D-Luciférine (Caliper Life Sciences, France). Des cellules Vero non transfectées sont utilisées pour déterminer le bruit de fond du signal de bioluminescence. Après trois minutes d'exposition, les signaux de bioluminescence sont obtenus en photons/s/cm<sup>2</sup>/steradian (p/s/cm<sup>2</sup>/sr). Les photons sont quantifiés par le logiciel Living Image version 4.0 (Caliper Life Sciences, France).

#### **4.8 Alignements**

Les séquences partielles ou entières du gène N des PPRV (avec ou sans mutations/délétion), RPV, MV, et CDV sont obtenues à partir des bases de données publiques ou ont été produites dans notre laboratoire (Tbleau 9). Les alignements ont été réalisés en utilisant MUSCLE émulé par le logiciel Seaview version 4.2.11 (Galtier et al., 1996 ; Gouy et al., 2010) ou CLUSTAL W émulé par le logiciel Vector NTI® (Invitrogen Life technologies S A S, France).

**Tableau 10. Souches de PPRV utilisées dans les analyses de séquences du gène N.**

Souche	Lignée	Origine	Année d'isolation	Source	GenBank accession no.
Nigeria/75/1	II	Nigeria	1975	IAH/UK; CIRAD/France	X74443
Nig75/1	II	Nigeria	1975	HVRI/China	HQ197753
ICV89	I	Côte d'Ivoire	1989	CIRAD/France	EU267273
China/Tibet/Geg/07-30	IV	China	2007	CAHEC/China	FJ905304
Ng76/1	II	Nigeria	1976	IAH/UK	EU267274
China/Tibet/0701	IV	China	2007	CAHEC/China	EU360596
Turkey/2000	IV	Turkey	2000	IAH/UK	AJ849636
Turkey/00	IV	Turkey	2000	IAH/UK	AJ563705
Mielik_72*	III	Sudan	1972	CIRAD/France	JN647693
Pradesh_95	IV	India	1995	CIRAD/France	JN647694
Revati-2006	IV	India	2006	IVRI/India	GU014574
Jhansi 03	IV	India	2003	IVRI/India	EU344738
Jhansi-2003	IV	India	2003	IVRI/India	GU014571
Sungri-96	IV	India	1996	IVRI/India	GQ452013
Bhopal 2003	IV	India	2003	IVRI/India	FJ750560
Revati 2005	IV	India	2005	IVRI/India	FJ750559
China/Tib/07	IV	China	2007	CAHEC/China	JF939201
Tib/07x11	IV	China	2007	YAASV/China	GQ184299
Izatnagar /1987	IV	India	1994	IVRI/India	AY840993
Dorcas_87	III	Oman	1987	CIRAD/France	JN647695
Burkina_Faso_1988	I	Burkina Faso	1988	CIRAD/France	JN647696
Marocco08	IV	Marocco	2008	CIRAD/France	JN647697
Guinea-Bissau_1989	II	Guinea Bissau	1989	CIRAD/France	JN647698
Ethiopia_1994	III	Ethiopia	1994	CIRAD/France	JN647699
India_1994	IV	India	1994	CIRAD/France	JN647700
mut_si1mut1	II	Nigeria	1975	CIRAD/France	JN647701
mut_si1mut2	II	Nigeria	1975	CIRAD/France	JN647702
mut_si1mut3	II	Nigeria	1975	CIRAD/France	JN647703
mut_si1mut4	II	Nigeria	1975	CIRAD/France	JN647704
mut_si1mut5_del	II	Nigeria	1975	CIRAD/France	JN647705
mut_si1_mut4_mut1	II	Nigeria	1975	CIRAD/France	JN647706
mut_si6mut1	II	Nigeria	1975	CIRAD/France	JN647707
mut_si6mut2	II	Nigeria	1975	CIRAD/France	JN647708
mut_si6mut3	II	Nigeria	1975	CIRAD/France	JN647709
mut_si6mut4	II	Nigeria	1975	CIRAD/France	JN647710
mut_si7mut1	II	Nigeria	1975	CIRAD/France	JN647711
mut_si7mut2	II	Nigeria	1975	CIRAD/France	JN647712
mut_si7mut3	II	Nigeria	1975	CIRAD/France	JN647713
mut_si7mut4	II	Nigeria	1975	CIRAD/France	JN647714
mut_si7mut5	II	Nigeria	1975	CIRAD/France	JN647715
mut_si1and7	II	Nigeria	1975	CIRAD/France	JN647716
mut_si1and6	II	Nigeria	1975	CIRAD/France	JN647717
mut_si6and7	II	Nigeria	1975	CIRAD/France	JN647718

IAH/UK, Institute for Animal Health; IVRI/India, Indian Veterinary Research Institute; Cirad/France, Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement; CAHEC/China, China Animal Health and Epidemiology Center; HVRI/China, Harbin Veterinary Research Institute; YAASV/China, Yunnan Academy of Animal Science and Veterinary; \* même séquence que Nig75/1.

#### 4.9 Analyses des séquences

La conservation de positions ciblées par les trois siARNs dans le gène N des morbillivirus est évaluée par des alignements multiples des acides nucléiques et des acides aminés en comparant avec la séquence de la souche vaccinale du PPRV Nigéria 75-1

(numéro d'accèsion X74443). Pour une analyse plus fine, les deux régions de 19 acides nucléiques flanquant les zones cibles de chaque siARNs ont également prises en compte afin d'être utilisées comme élément de comparaison. Un système de scores est défini et attribué de la façon suivante pour chaque modification observée dans ces régions :

1. Transition versus transversion : 1 = pas de modification, 2 = transition, 3 = transversion, 4 = transversion jamais retrouvée auparavant dans un morbillivirus.
2. Modification de acide nucléique dans le codon : 1 = pas de modification, 2 = modification à la position 3 du codon, 3 = modification à la position 1 du codon, 4 = modification à la position 2 du codon.
3. Modification de la préférence du codon d'usage : 1 = pas de modification, 2 = pas de modification de l'acide amine et codon d'usage le plus représenté, 3 = pas de modification de l'acide amine et codon d'usage le moins représenté, 4 = modification de l'acide aminé.
4. Modification de l'acide aminé : 1 = pas de modification, 2 = substitution synonyme, 3 = substitution non-synonyme, 4 = substitution non-synonyme jamais retrouvée auparavant dans un morbillivirus.

Ces scores seront ensuite utilisés dans une analyse statistique. En parallèle, les alignements des acides nucléiques du gène N entier des morbillivirus sont utilisés dans une reconstruction phylogénétique par une approche bayésienne (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Le modèle proposé par Treefinder en maximum de vraisemblance (version de mars 2011, Munich, Allemagne, distribuée par l'auteur à [www.treefinder.de](http://www.treefinder.de)) avec une discrétisation gamma à cinq catégories est le modèle GTR à neuf paramètres. Ce modèle est sélectionné pour l'analyse bayésienne. Les arbres résultants de cette analyse et les alignements multiples correspondants sont ensuite employés dans une analyse dN/dS (ratio de substitutions non-synonymes, dN et des substitutions synonymes, dS) mise en application par Codeml dans PAML (Yang, 2007). En bref, le ratio de substitutions nucléotidiques non-synonymes/synonymes est calculé en prenant en compte la séquence entière du gène N. Un  $dN/dS < 1$ ,  $= 1$ , ou  $> 1$  indique une sélection négative, neutre et positive, respectivement. Une analyse d'horloge moléculaire sur toutes les séquences de gène N de PPRV disponibles

est également effectuée en utilisant le logiciel BEAST et un modèle d'horloge moléculaire strict (Drummond & Rambaut, 2007).

#### **4.10 Analyses statistiques**

Les résultats de l'essai avec le plasmide rapporteur basé sur le gène de la luciférase sont analysés par le test non-paramétrique de Wilcoxon (Wilcoxon, 1945) et ensuite ajustés par le test de Holm (Holm, 1979).

Pour évaluer l'effet de la pression de sélection des trois siARNs sur le gène de la protéine N, une analyse factorielle multiple (AFM) est employée (Escofier et Pagès, 1994 ; Manly, 2006). Plus spécifiquement, l'AFM est utilisée pour évaluer les relations entre les souches de PPRV et les variables caractérisant les mutations virales, séparées en quatre catégories (comme décrit dans la section précédente), et pour lesquelles nous avons attribué des scores pour toutes les souches du PPRV. L'AFM permet de construire des scores synthétiques des quatre catégories de variables, dont les propriétés mathématiques permettent d'identifier des profils de mutations et d'expliquer l'hétérogénéité de ces mutations en termes de signification biologique, notamment par l'effet des siARNs. Un test de permutation est engagé pour évaluer si les mutations observées naturellement chez les souches de PPRV rencontrées dans la nature sont statistiquement différentes de celles induites par nos siARNs. Les scores moyens issus de l'AFM sont calculés pour ces deux groupes de PPRV, ainsi que la distance euclidienne entre les centroïdes ainsi obtenus. La même opération est effectuée après permutation aléatoire de l'appartenance des souches à l'un des deux groupes, aboutissant à une nouvelle distance entre les centroïdes. L'algorithme est répété 9 999 fois en stockant la distance à chaque itération. La valeur initiale est comparée aux 9 999 valeurs obtenues par le processus de permutation. La proportion de valeurs plus élevées que la valeur initiale donne la valeur  $p$  du test.

Une analyse de survie (Hosmer & Lemeshow, 1999) est appliquée pour examiner l'occurrence des modifications observées dans les trois zones cibles des siARNs. Une mutation/délétion sur un acide nucléique d'une zone cible est considérée comme une résistance aux traitements par les siARNs, et le nombre de transfections successives nécessaires pour sélectionner cette résistance est pris en compte et considéré comme le temps de survie.

- Une analyse de Kaplan-Meier (Kaplan & Meier, 1958) est employée pour la présentation graphique de ces résultats. Ces graphiques représentent la courbe de survie de la souche parentale du vaccin Nigéria 75/1, face aux traitements successifs avec les siARNs et la probabilité pour cette souche de résister à la pression de sélection à travers des modifications de la séquence ciblée. Quand aucune modification ne se produit après 20 passages, la probabilité de survie reste de un à l'issue de ces 20 passages, et les observations sont censurées à droite (pas de résistance sélectionnée).
- Pour estimer l'effet de chaque siARN sur la probabilité des mutations/délétion des acides nucléiques de chaque zone ciblée, un modèle semi-paramétrique des risques proportionnels (de mutation) de Cox (Cox & Oakes, 1984) est utilisé. Ce modèle fournit des estimations du risque relatif (*RR*) de mutation, le risque de mutation observé pour le siNPPRV1 étant utilisé comme base de comparaison.



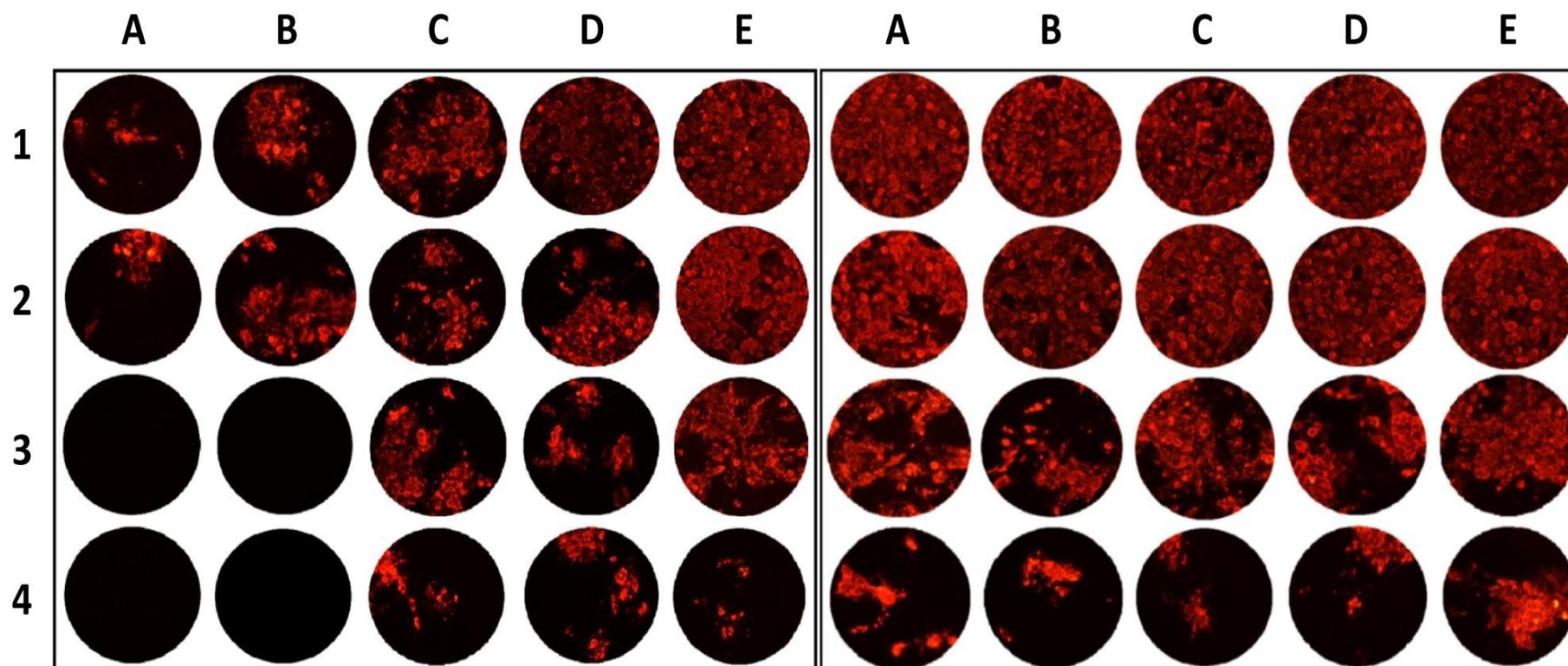
## 5 RESULTATS

### 5.1 Effet dose dépendant des siARNs ciblant des régions conservées du gène N

Après infection des cellules Vero, le virus de la PPR se multiplie assez rapidement induisant un effet cytopathique évident à trois jours post-infection avec un titre maximal pouvant être observé entre quatre et cinq jours. Les titres habituellement rencontrés varient de  $10^{4,5}$  à  $10^6$  DICC50/ml. Cependant, une inhibition dose-dépendante de la multiplication de la souche vaccinale Nigéria 75/1 a pu être clairement observée en présence d'un ou d'une combinaison de deux ou trois siARNs à une concentration finale de 3,7 à 100 nM de chaque siARN (Figure 21). Ceci est en conformité avec les travaux précédents où une réduction de l'ECP a été observée et liée à une réduction de quatre à cinq logs du titre viral (Servan de Almeida et al., 2007 ; Keita et al., 2008). Cependant, au terme de quelques transfection successives avec un ou une combinaison de deux siARNs, l'émergence d'une résistance virale est détectée à travers l'augmentation de l'ECP et la perte de l'effet inhibiteur dose-dépendant du siARN (Figure 21). Les mutants d'échappement obtenus, après transfection avec le siNPPRV1 et purifiés, ont présenté des titres entre  $10^{3,7}$  et  $10^{5,1}$  DICC50/ml. Le titre pour le virus avec la délétion a été de  $10^{4,9}$  DICC50/ml. Ces titres ont été proches de celui observé pour la souche vaccinale de départ ( $10^5$  DICC50/ml), démontrant que les mutants d'échappement ne présentent pas une réduction de leur efficacité de réplication *in vitro*. Une fois la résistance détectée, les virus collectés sont envoyés au séquençage pour confirmation de l'apparition d'une mutation d'échappement.

## Virus parental

## Virus d'échappement



Virus parental						Virus d'échappement					
	A	B	C	D	E		A	B	C	D	E
1	+	++	+++	++++	+++++	1	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
2	+	+	++	+++	++++	2	++++	++++	++++	++++	++++
3	-	-	+	++	+++	3	+++	+++	+++	+++	+++
4	-	-	+	+	++	4	++	++	++	++	++

**Figure 21. Détection de la N par immunofluorescence et observation de l'ECP.** Les cellules Vero sont transfectées avec 100 ; 33,3 ; 11,1 ; 3,7, et 0 nM de siNPPRV1 dans les colonnes A à E, respectivement. Ces mêmes cellules sont infectées avec 0,1 MOI de la souche vaccinale Nigéria 75/1 du PPRV (images de gauche) et d'un virus mutant d'échappement (si1mut1, images de droite) dans la ligne une et des dilutions au dixième dans les lignes 2 à 4. La première image montre l'expression virale présente quatre jours après l'infection par IF en utilisant un anticorps monoclonal couplé TRITC et spécifique de la protéine N des morbillivirus. La seconde image présente les scores d'ECP observés au microscope inversé quatre jours après l'infection.

## **5.2 Evaluation de l'efficacité des siARNs (siNPPRV1, siNPPRV6 et siNPPRV7) face aux souches sauvages de PPRV disponibles au laboratoire de virologie du Cirad**

Les résultats obtenus dans l'évaluation de l'efficacité des siARNs siNPPRV1, siNPPRV6 et siNPPRV7 ont mis en évidence que les siNPPRV1 et siNPPRV6 sont efficaces contre toutes les souches testées au laboratoire. En revanche, le siNPPRV7 n'est actif que contre la souche Nigéria 75/1 (Tableau 11). Après séquençage des trois zones cibles des siARNs sur l'ensemble des souches sauvages testées, il est confirmé que le siNPPRV1 se retrouve bien sur une région très conservée avec 100% d'identité entre toutes les souches. En ce qui concerne la zone ciblée par le siNPPRV6, seule la souche Marocco/2008 présente un acide nucléique différent en position 14 (un G à la place d'un A). Néanmoins, le siNPPRV6 reste actif sur cette souche. Sur la cible du siNPPRV7, toutes les souches présentent une ou plusieurs mutations pouvant expliquer l'absence d'effet de ce siARN sur les souches sauvages. L'ensemble de ces résultats est présenté dans le Tableau 11.

**Tableau 11. Efficacité des siARNs (siNPPRV1, siNPPRV6 et siNPPRV7) face aux souches sauvages du PPRV disponibles au laboratoire de virologie du Cirad et analyse de séquences des trois zones ciblées.** En gras sont présentés les acides nucléiques différents de la séquence Nigéria 75/1, pour la même position.

Souche	Ligné	siNPPRV1	siNPPRV6	siNPPRV7
<b>Nigéria 75/1 vaccinale</b>	II	Inhibition GGATCAACTGGTTTGAGAA	Inhibition GGCGGTTCATGGTATCTCT	Inhibition GCATTAGGCCTTCACGAGT
<b>Nigéria 75/1 sauvage</b>	II	Inhibition GGATCAACTGGTTTGAGAA	Inhibition GGCGGTTCATGGTATCTCT	Inhibition GCATTAGGCCTTCACGAGT
<b>ICV89</b>	I	Inhibition GGATCAACTGGTTTGAGAA	Inhibition GGCGGTTCATGGTATCTCT	Pas d'inhibition GCATTAGGTCTTCACGAGT
<b>Burkina Faso/1988</b>	I	Inhibition GGATCAACTGGTTTGAGAA	Inhibition GGCGGTTCATGGTATCTCT	Pas d'inhibition GCATTAGGTCTTCACGAGT
<b>Dorcas/1987</b>	III	Inhibition GGATCAACTGGTTTGAGAA	Inhibition GGCGGTTCATGGTATCTCT	Pas d'inhibition GCACTAGGTCTTCACGAGT
<b>Mielik/1972</b>	III	Inhibition GGATCAACTGGTTTGAGAA	Inhibition GGCGGTTCATGGTATCTCT	Pas d'inhibition GCACTAGGTCTTCACGAGT
<b>Marocco/2008</b>	IV	Inhibition GGATCAACTGGTTTGAGAA	Inhibition GGCGGTTCATGGTGTCTCT	Pas d'inhibition GCATTAGGGCTCCACGAGT
<b>India Pradesh/1995</b>	IV	Inhibition GGATCAACTGGTTTGAGAA	Inhibition GGCGGTTCATGGTATCTCT	Pas d'inhibition GCATTAGGGCTCCACGAGT

### 5.3 Emergence des mutants d'échappement

Pour examiner la capacité du PPRV à acquérir une résistance aux siARNs seuls ou en association avec deux ou trois, des transfections consécutives avec différentes concentrations (de 3,7 à 100 nM) sont effectuées *in vitro*. Quand la perte de l'effet dose-dépendant associée à une augmentation de l'ECP est observée dans les plaques de transfections, les virus sont envoyés au séquençage afin de vérifier la présence des modifications sur la totalité du gène N.

Des mutants d'échappement sont détectés après les traitements successifs avec les trois siARNs testés individuellement ou en combinaison par paire. Des mutations simples ou multiples de type synonymes ou non-synonymes et une délétion de six acides nucléiques dans les zones cibles des siARNs sont observées (Tableau 12A). Toutes les mutations et la délétion sont retrouvées sur les zones ciblées par les siARNs, c'est-à-dire, qu'aucune autre modification n'est rencontrée ailleurs dans le gène de la nucléoprotéine. Aucune mutation n'est retrouvée sur le virus traité avec l'association des trois siARNs au terme de 20 transfections successives.

Les mutations sont concentrées dans les positions trois à sept, huit à dix, et huit et neuf respectivement pour le siNPPRV1, siNPPRV6, et siNPPRV7 (Tableau 12A et 11B). En conséquence, un nombre limité d'acides aminés est modifié. La fréquence des mutations non-synonymes est élevée, avec quatre mutations sur huit pour le siNPPRV1, 2/6 pour le siNPPRV6 et 1/7 pour le siNPPRV7 (Tableau 12B). Cependant, cette fréquence est inversement proportionnelle au nombre possible de codons pour un acide aminé donné, illustrant ainsi une prédominance des substitutions synonymes quand une telle option existe.

**Tableau 12. Mutations et délétion observées face aux siARNs in vitro.**

(A)	nom du mutant	siNPPRV1	siNPPRV6	siNPPRV7	passage
	sequence				
1	originale	AGG ATC AAC TGG TTT GAG AAC	CGG CGG TTC ATG GTA TCT CTC	GCA TTA GGC CTT CAC GAG TTC	
2	silmut1	--- -- GG- --- --- ---	--- --- --- --- --- ---	--- --- --- --- --- ---	7
3	silmut2	--- --A --- --- --- ---	--- --- --- --- --- ---	--- --- --- --- --- ---	8
4	silmut3	--- --A --- --- --- ---	--- --- --- --- --- ---	--- --- --- --- --- ---	10
5	silmut4	--- --- -G- --- --- ---	--- --- --- --- --- ---	--- --- --- --- --- ---	9
6	silmut5	-XX XXX X-- --- --- ---	--- --- --- --- --- ---	--- --- --- --- --- ---	15
7	sil_mut4_mut1	--- --- -C- --- --- ---	--- --- --- --- --- ---	--- --- --- --- --- ---	4
8	si6mut1	--- --- --- --- --- ---	--- --- --- -C- --- ---	--- --- --- --- --- ---	7
9	si6mut2	--- --- --- --- --- ---	--- --- --- T-- --- ---	--- --- --- --- --- ---	7
10	si6mut3	--- --- --- --- --- ---	--- --- --T --- --- ---	--- --- --- --- --- ---	4
11	si6mutt4	--- --- --- --- --- ---	--- --- --T --- --- ---	--- --- --- --- --- ---	4
12	si7mut1	--- --- --- --- --- ---	--- --- --- --- --- ---	--- --- --G --- --- ---	3
13	si7mut2	--- --- --- --- --- ---	--- --- --- --- --- ---	--- --- --G --- --- ---	6
14	si7mut3	--- --- --- --- --- ---	--- --- --- --- --- ---	--- --- --G --- --- ---	5
15	si7mut4	--- --- --- --- --- ---	--- --- --- --- --- ---	--- --- --G --- --- ---	5
16	si7mut5	--- --- --- --- --- ---	--- --- --- --- --- ---	--- --- -C- --- --- ---	5
17	siland7	--- --- --T --- --- ---	--- --- --- --- --- ---	--- --- --G --- --- ---	20;8
18	siland6	--- G-- --- --- --- ---	--- --- --- --- --- ---	--- --- --- --- --- ---	13
19	si6and7	--- --- --- --- --- ---	--- --- --T --- --- ---	--- --- --G --- --- ---	12;12
20	siland6and7	--- --- --- --- --- ---	--- --- --- --- --- ---	--- --- --- --- --- ---	

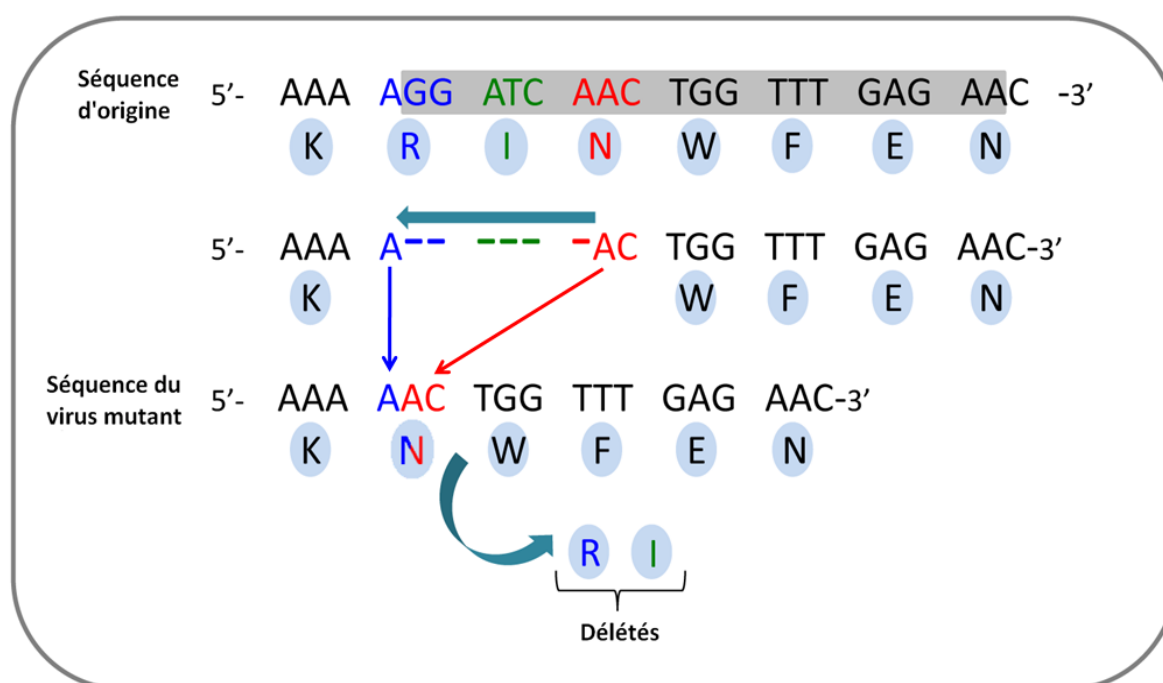
(B)

Cibles	Séquence d'acide aminé dans la zone ciblé							Fréquence de mutation des acides aminés
siNPPRV1 Mutations observés	R <sub>6</sub>	I <sub>3</sub> V	N <sub>2</sub> G S T	W <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	E <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	4/8 tests
Nombre de modifications NS/S		1/3	3/4					
siNPPRV1 Délétion	X	X						1/8 tests
siNPPRV6 Mutations observés	R <sub>6</sub>	R <sub>6</sub>	F <sub>2</sub> M <sub>1</sub> S T	V <sub>4</sub>	S <sub>6</sub>	L <sub>6</sub>		2/6 tests
Nombre de modifications NS/S			0/2 2/2					
siNPPRV7 Mutations observés	A <sub>4</sub>	L <sub>6</sub>	G <sub>4</sub> A	L <sub>6</sub>	H <sub>2</sub>	E <sub>2</sub>	F <sub>2</sub>	1/7 tests
Nombre de modifications NS/S			1/7					

- (A) Mutations nucléotidiques issues du traitement par les différents siARNs utilisés. siNPPRV1 (lignes 2-6), siNPPRV1mut4 (ligne 7), siNPPRV6 (lignes 8-11), siNPPRV7 (lignes 12-16), siNPPRV1 + siNPPRV7 (ligne 17), siNPPRV1 + siNPPRV6 (ligne 18), siNPPRV6 + siNPPRV7 (ligne 19) et siNPPRV1 + siNPPRV6 + siNPPRV7 (ligne 20). La ligne 1 présente la séquence nucléotidique d'origine de la souche vaccinale du PPRV Nigéria 75/1 (les lettres qui correspondent à la zone ciblée dans le cadre de lecture sont surlignées). Aucune modification n'a été rencontrée au bout de 20 transfections consécutives *in vitro* quand les trois siARNs sont combinés (ligne 20). La colonne "passage" indique le nombre de transfections nécessaires pour la détection de la modification. si(x)mut(y), (x)= numéro du siARN qui a induit le mutant et (y)= numéro du mutant.
- (B) Visualisation des mutations non-synonymes. Les modifications des acides aminés des séquences ciblées par les siARNs après les transfections successives sont représentées au-dessous de la séquence originale. Les indices dans la séquence originale indiquent le nombre possible de codons pour inclure l'acide aminé correspondant. Les régions marquées en gris représentent les positions de la cible modifiées par les mutations (synonymes ou non-synonymes) ou la délétion.



Pour un des mutants obtenus, une délétion de six nucléotides est observée. La « règle des six », nécessaire à une réplication optimale de tous les virus de la sous-famille *Paramyxovirinae*, a été respectée. Même si cette délétion est en déphasage avec le cadre de lecture, elle n'est pas délétère pour le virus. La séquence protéique en aval de la délétion est conservée : le réarrangement du génome après délétion a permis la reconstitution du dernier codon et la restitution du cadre de lecture avec la perte de seulement deux acides aminés (Figure 22). Cette délétion, ainsi que toutes les mutations observées sur les virus d'échappement n'affectent pas la capacité de multiplication de ces virus.



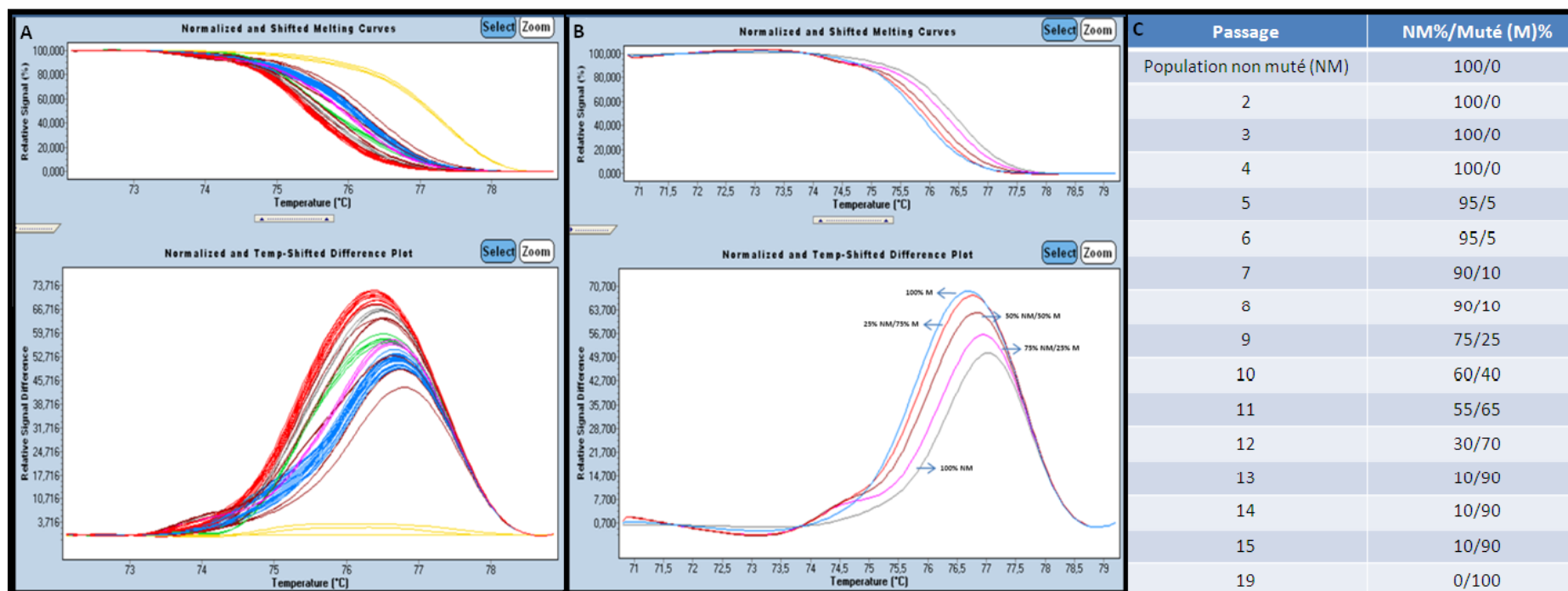
**Figure 22. Délétion observée après 15 transfections successives *in vitro* sous pression de sélection du siNPPRV1.** Une délétion de six acides nucléiques est observée en déphasage du cadre de lecture. En gris, la séquence ciblée par le siNPPRV1. Au final, une perte de seulement deux acides aminés est observée (R et I). Le reste de la protéine n'a pas été modifié.

Le nombre de passages requis pour l'acquisition de la résistance à l'interférence ARN à travers des mutations simples ou doubles d'acides nucléiques est de trois à dix (Tableau 11A). La délétion est obtenue après 15 passages. Toutefois, avec une association de deux siARNs, les mutants d'échappement sont obtenus après seulement 12 à 20 transfections successives, démontrant ainsi que la résistance est plus difficilement acquise. L'association des trois siARNs a empêché l'apparition de virus d'échappement et ce, jusqu'à 20 passages consécutifs.

L'utilisation des deux siARNs modifiés (siNPPRV1mut1 or siNPPRV1mut4) ciblant deux mutants d'échappements montre également une forte inhibition de la réplication des virus mutants correspondants (si1mut1 et si1mut4). L'hypothèse d'un possible retour à l'acide nucléique d'origine ou la génération d'une nouvelle mutation pour échapper au siNPPRV1mut4 a été examinée en employant le mutant correspondant. Au lieu d'avoir une réversion de la première mutation, un nouveau mutant d'échappement (si1\_mut4\_mut1) est rapidement obtenu. Une mutation ponctuelle (C/G) de type synonyme est générée à la même position que la première mutation (position sept ; Tableau 11A) au bout de seulement quatre transfections consécutives.

#### **5.4 Cinétique d'apparition et de multiplication des mutants**

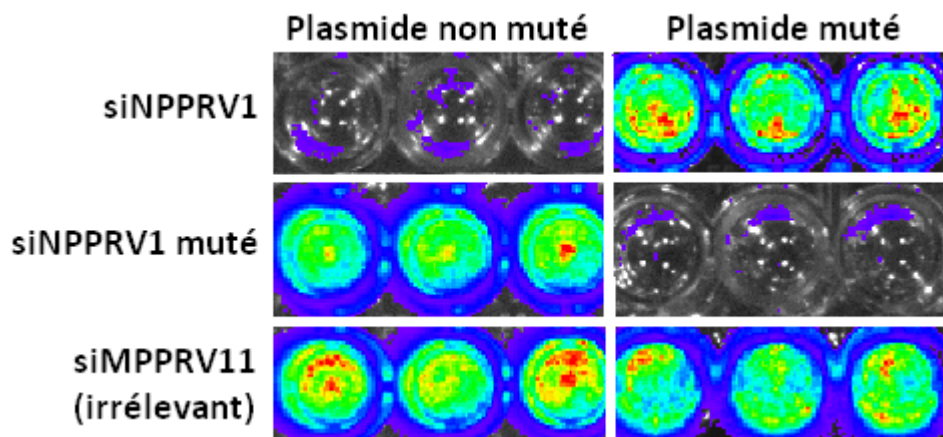
Une *high-resolution melting* real-time PCR (PCR-HRM) a été développée pour analyser la cinétique d'apparition et de multiplication du virus mutants d'échappement si1mut3 par rapport au virus parental. Avec l'utilisation d'une gamme contenant différents ratios de la population parentale et mutée, une quantification de la proportion de chaque population dans chaque transfection consécutive est possible. Cet essai est réalisé avec les passages successifs du si1mut3 (mutation d'un A/C à la position sept de la zone cible du siNPPRV1 ; Tableau 11A). La résistance à l'ARNi est d'abord observée par l'augmentation de l'ECP et la disparition de l'effet/dose du siNPPRV1 au passage huit. L'émergence d'un mutant est confirmée par séquençage quand une mutation synonyme est détectée en position sept de la zone cible au passage dix. Le résultat obtenu avec la PCR-HRM montre une première modification de la courbe de fusion, synonyme d'une modification de la séquence amplifiée, à partir du passage cinq. Ensuite, la proportion de la population mutante augmente rapidement et graduellement dans les passages suivants, comme démontré dans la Figure 23. En effet, jusqu'au passage quatre, 100% de la population virale est composée de virus parental et au passage 19, plus aucune trace de ce virus n'est détectée.



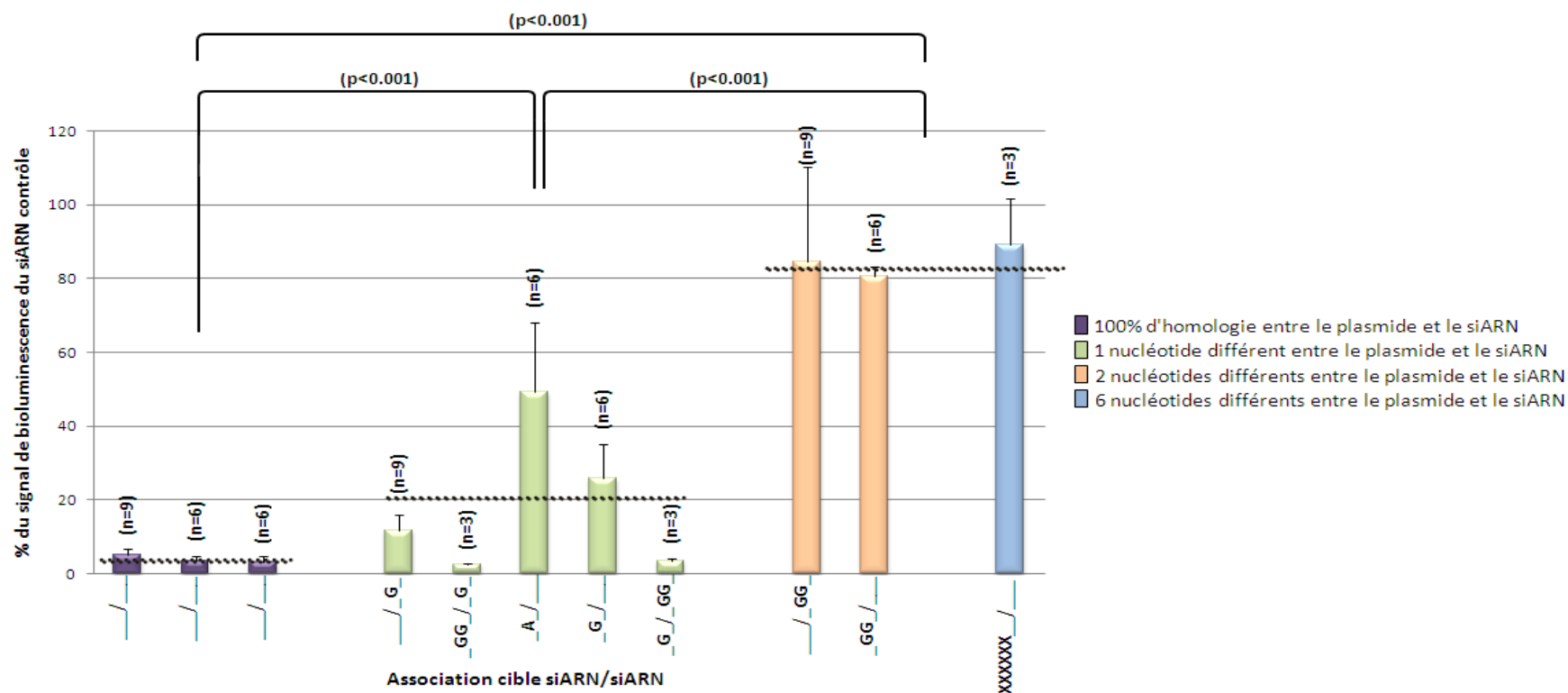
**Figure 23. Résultats du high-resolution melting real-time PCR (PCR-HRM).** (A) Courbes de fusion de l'ensemble des suspensions virales testées. (B) Courbe standard avec les différents ratios de la population parentale (non-muté, NM) et de la population mutée (M ; 100/0%, 75/25%, 50/50%, 25/75%, 0/100% de NM/M, respectivement). (C) Quantification des populations NM et M dans chaque transfection successive.

## 5.5 Confirmation du rôle des mutations et de la délétion dans l'échappement au siNPPRV1

Pour déterminer si les mutations et la délétion observées dans la région cible du siNPPRV1 sont directement responsables de l'échappement à l'ARNi, un système basé sur des plasmides rapporteurs, où les séquences cible du siNPPRV1 non mutée ou mutée sont placées directement en amont de la séquence du gène de la luciférase Firefly. Le siNPPRV1 original et les siARNs modifiés selon les mutants retrouvés (siNPPRV1mut1 et siNPPRV1mut4), ainsi que le siMPPRV11 (siARN contrôle) sont testés face aux différents plasmides. L'intensité de l'expression de la luciférase Firefly est mesurée par bio-imagerie (Figure 24). Toutes les mutations et la délétion obtenues après les transfections successives avec le siNPPRV1 sont confirmées comme directement responsables de l'échappement à l'ARNi (Figure 25). Les divergences entre la séquence du siARN utilisé et la séquence cible ont été directement proportionnelles à la résistance à l'ARNi. Ainsi, la délétion et la double mutation ont montré le plus haut niveau de résistance face au siNPPRV1 (Figure 25).



**Figure 24.** Signal de bioluminescence des plasmides rapporteurs avec la séquence cible du siNPPRV1 non muté ou muté face au siNPPRV1 non muté ou muté. Le siMPPRV11 a été utilisé comme contrôle de la transfection.



**Figure 25. Activité de différents siARNs sur différentes cibles *in vitro*.** Les cellules Vero sont co-transfectées avec un plasmide rapporteur contenant la séquence cible du siNPPRV1 non muté (siRNA-NPPRV1) ou muté (siNPPRV1-mut1, siNPPRV1-mut3, ou siNPPRV1-mut4) en amont de la séquence ARNm du gène de la Luciférase Firefly et les différents siARNs (siNPPRV1, siNPPRV1mut1, siNPPRV1mut4 ou siMPPRV11). La différence entre la zone cible du siARN présente dans le plasmide rapporteur et le siARN utilisé est représentée sur l'axe des abscisses, \_\_/\_\_ = séquence cible du siNPPRV1/séquence du siARN. Le niveau du signal (axe des ordonnées) a été transformé en rapport sur le signal obtenu pour le siMPPRV11 (siARN contrôle). Le nombre de répétitions (n=x) de chaque transfection est donné sur le dessus des barres d'histogramme. Les barres d'erreur représentent les écarts-types des répétitions. Les résultats obtenus pour tous les mutants ont été statistiquement significatifs ( $p < 0.001$ ). Les lignes pointillées horizontales représentent la moyenne de chaque groupe.

## 5.6 Conservation des zones cibles et flanquantes des siARNs

Afin de vérifier si la variabilité obtenue *in vitro* et induite par les siARNs, est comparable à celle observée dans la nature, la conservation des régions cibles des trois siARNs (position 480-498 dans l'ARNm pour le siNPPRV1, 741-759 pour le siNPPRV6 et 899-917 pour le siNPPRV7) a été réévaluée au niveau des acides nucléiques et des acides aminés. Pour cela, toutes les souches de PPRV, RPV, MV et CDV (canine distemper virus) disponibles dans les bases de données publiques ou générées dans notre laboratoire ont été utilisées. Comme base de comparaison, les 19 acides nucléiques en amont et en aval des zones cibles de chaque siARN ont été considérés. Un total de 25 séquences de PPRV (Tableau 10), 13 de RPV, 239 de MV et 66 de CDV a été inclus dans l'évaluation.

En prenant seulement en compte les 25 séquences de PPRV, les conservations en acides nucléiques et en acides aminés sont de 100/100%, 96/100%, et 64/100% respectivement pour les régions cibles du siNPPRV1, 6 et 7. Pour les régions flanquantes, les niveaux de conservation sont un peu plus faibles avec une variation de 60% à 88% pour les acides nucléiques et de 52% à 100% pour les acides aminés (Figure 26).

La conservation sur l'ensemble des 343 séquences de morbillivirus est de 52,5%, 49,1% et 81,7% sur les acides nucléiques pour les zones cibles N1, N6 et N7, respectivement. Pour les 19 acides nucléiques en amont des zones cibles, l'identité des séquences est de 32,6%, 60,6%, et 73,1% et pour les 19 acides nucléiques en aval des zones cibles, 87,9%, 50,9%, et 63,7% pour les cibles N1, N6 et N7. L'identité des séquences d'acides aminés est de 76,1%, 96,5%, et 99,7% pour les zones cibles, 57,4%, 99,4%, et 99,7% pour les régions en amont des cibles, et 98,1%, 98,5%, et 99,7% pour les régions en aval des zones ciblées par les siARNs (Figure 26).

	région avant la cible	région cible du siARN	région après la cible
Nigeria 75/1 siNPPRV1	T C G A G T G G A A G T A A G A A A A	G G A T C A A C T G G T T T G A G A A A	C A G A G A A A T A A T A G A C A T A
MV siNMV1	A G T A G T A G T G A T C A A T C C A	G G T T C G G A T G G T T T C G A G A A	C A A G A A A T C T C A G A T A T T
RPV siNRPV 1	A A T G A C G G A G A A G A A A G G C	A G T C T T A T T G G T T T G A G A A A	T C C G A G A G A T T C A A G A C A T T
CDV siNCDV1	G G G T C G A A A G C T C A A G G A C	A A T T A G G C T G G T T G G A G A A A	T A A G G A T A T T G T A G A C A T A
Nigeria 75/1 siNPPRV6	G C A G A A G A T C T A T C A C T T T C	G G C G G T T C A T G G T A T C T C T	C A T A C T T G A C A T C A A A A G G
MV siNMV6	G C C G A G G A C C T C T C C T T A C	G C C G A T T C A T G G T C G C T C T	A A T C C T G G A T A T C A A G A G A
RPV siNRPV6	G C A G A A G A T C T C T C C T T A C	G C A G A T T T A T G G T G G C A T T	G A T C T T A G A C A T C A A G A G A
CDV siNCDV6	G C T G A G G A C T T A T C T T T G A	G G C G G T T C A T G G T G G C A C T	C A T C T T G G A T A T C A A A C G A
Nigeria 75/1 siNPPRV7	T A T T G A A A C C A T G T A T C C T	G C A T T A G G C C T T T C A C G A G T	T C G C C G G G G A A T T G T C C A C
MV siNMV7	G A T A G A A A C T A T G T A T C C T	G C T C T T G G A C T G C A T G A A T	T T G C T G G T G A G T T A T C C A C
RPV siNRPV7	T A T A G A A A C T A T G T A C C C A	G C A C T G G G C C T G C A T G A A T	T C G C C G G A G A G C T C T C C A C
CDV siNCDV7	C A T T G A A A C T A T G T A T C C G	G C T C T T G G G T T G C A T G A G T	T T T C C G G A G A G T T A A C A A C
Nigeria 75/1 siNPPRV1	4 5 5 5 5 5 5 5 4 3 5 4 5 5 4 5 5 5 5 5	5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	5 5 5 4 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5
MV siNMV1	4 4 3 5 4 4 4 4 4 5 5 5 5 5 4 4 4 4 5	4 4 5 3 4 5 5 4 5 5 5 5 5 3 5 4 4 5 4	4 5 5 4 5 5 4 5 5 4 5 5 4 5 5 4 4 5 4 5 4
RPV siNRPV 1	5 5 5 5 4 5 5 5 3 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	4 5 5 4 5 5 5 3 5 5 5 5 5 4 5 5 5 5 5 5	5 4 5 3 5 5 3 5 5 3 5 5 4 5 5 4 5 5 5 5
CDV siNCDV1	5 4 4 5 5 5 5 4 4 5 5 5 5 5 4 5 5 4 5 5	4 5 5 5 5 5 5 5 4 5 5 5 5 5 4 5 5 4 5 5	5 5 5 5 5 5 5 5 5 4 5 5 4 5 5 5 5 5 5 5
Nigeria 75/1 siNPPRV6	5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 4 5 5 5 5 3 5 5	5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 4 5 5 5 5 5 5	4 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 4 5 5 5
MV siNMV6	5 5 4 5 5 4 5 5 4 4 5 5 5 4 5 5 4 4 5 4 5	5 4 5 4 4 5 5 5 5 5 5 5 5 4 5 5 4 4 5	4 5 5 4 5 5 4 4 4 5 4 5 5 4 5 5 5 5 4 4
RPV siNRPV6	5 5 5 5 5 4 5 5 5 5 5 5 5 3 4 5 5 5 5	5 5 5 5 3 5 5 3 5 5 5 5 5 4 5 5 5 3 5	5 5 5 4 3 5 3 5 5 3 5 5 5 5 5 5 5 5 5
CDV siNCDV6	5 5 4 5 5 5 5 5 5 4 5 4 5 5 4 5 5 5 5	5 4 5 5 3 5 5 5 4 5 5 5 5 3 5 5 4 5 5	4 5 5 4 4 5 5 5 5 3 5 5 5 5 5 4 4 5 5
Nigeria 75/1 siNPPRV7	4 5 5 3 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	5 5 5 4 5 4 5 5 3 5 5 3 5 5 5 5 5 5 5	5 4 5 5 5 5 5 5 5 5 5 4 4 5 5 5 5 5 5
MV siNMV7	4 5 5 5 5 5 4 5 5 4 5 5 5 5 4 4 5 5 4	5 5 5 5 5 4 5 4 4 4 5 4 5 5 5 5 5 5 5	5 4 5 4 4 5 5 4 5 5 4 5 4 5 5 4 5 5
RPV siNRPV7	4 5 5 5 5 5 4 5 5 5 5 5 5 5 4 5 5 4	5 5 4 4 5 5 5 4 5 5 4 5 5 5 5 5 4 5	5 4 5 5 4 5 5 4 5 5 4 5 5 5 5 5 5 5
CDV siNCDV7	5 5 5 5 5 5 4 5 5 4 5 5 5 5 5 4 5 5 4	5 5 4 5 5 4 5 5 4 5 5 5 5 4 5 5 4 5	5 4 5 5 3 5 5 4 5 5 4 5 5 4 5 5 5 5
Nigeria 75/1 siNPPRV1	S S G S K K	R I N W F E N	R E I I D I
MV siNMV1	S S S D Q S	R F G W F E N	K E I S D I
RPV siNRPV 1	N D G E E R	Q S Y W F E N	R E I Q D I
CDV siNCDV1	G S K A Q G	Q L G W L E N	K D I V D I
Nigeria 75/1 siNPPRV6	A E D L S L	R R F M V S L	I L D I K R
MV siNMV6	A E D L S L	R R F M V A L	I L D I K R
RPV siNRPV6	A E D L S L	R R F M V A L	I L D I K R
CDV siNCDV6	A E D L S L	R R F M V A L	I L D I K R
Nigeria 75/1 siNPPRV7	I E T M Y P	A L G L H E F	A G E L S
MV siNMV7	I E T M Y P	A L G L H E F	A G E L S
RPV siNRPV7	I E T M Y P	A L G L H E F	A G E L S
CDV siNCDV7	I E T M Y P	A L G L H E F	A G E L T
Nigeria 75/1 siNPPRV1	4 5 4 3 5 5	5 5 5 5 5 5 5	5 5 5 5 5 5
MV siNMV1	4 4 4 5 5 4	4 3 5 5 5 4 4	5 5 5 5 4 4
RPV siNRPV 1	5 4 4 5 5 5	4 4 5 5 5 5 5	5 3 5 5 5 5
CDV siNCDV1	4 5 4 5 5 5	4 5 5 5 5 5 5	5 5 5 5 5 5
Nigeria 75/1 siNPPRV6	5 5 5 5 5 5	5 5 5 5 5 5 5	5 5 5 5 5 5
MV siNMV6	5 5 4 5 5 5	5 4 5 5 5 5 5	5 4 4 5 5 4
RPV siNRPV6	5 5 5 5 5 5	5 5 5 5 5 5 5	5 5 5 5 5 5
CDV siNCDV6	5 5 5 5 5 5	5 5 5 4 5 5 5	5 5 4 5 5 5
Nigeria 75/1 siNPPRV7	5 5 5 5 5 5	5 5 5 5 5 5 5	5 5 5 5 5
MV siNMV7	5 5 5 5 4 5	5 5 4 5 5 5 5	4 5 5 5 5
RPV siNRPV7	5 5 5 5 5 5	5 5 5 5 5 5 5	5 5 5 5 5
CDV siNCDV7	5 5 5 5 5 5	5 5 5 5 5 5 5	5 5 5 5 5

**Figure 26. Conservation des zones cibles et des régions flanquantes des siARN N1, N6 et N7.** La partie supérieure montre la conservation nucléotidique entre la souche vaccinale Nigéria 75/1 du PPRV et la séquence consensus d'autres morbillivirus (CDV, RPV et MV). La partie inférieure illustre la conservation des séquences d'acides aminés entre les 25 séquences de PPRV, 239 de MV, 13 de RPV et 66 de CDV. Les numéros représentent le niveau d'identité de chaque position pour chaque groupe de morbillivirus, les scores étant de : 1=0-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-99%, et 5=100%.

## 5.7 Analyse de la variabilité génomique induite par les siARNs

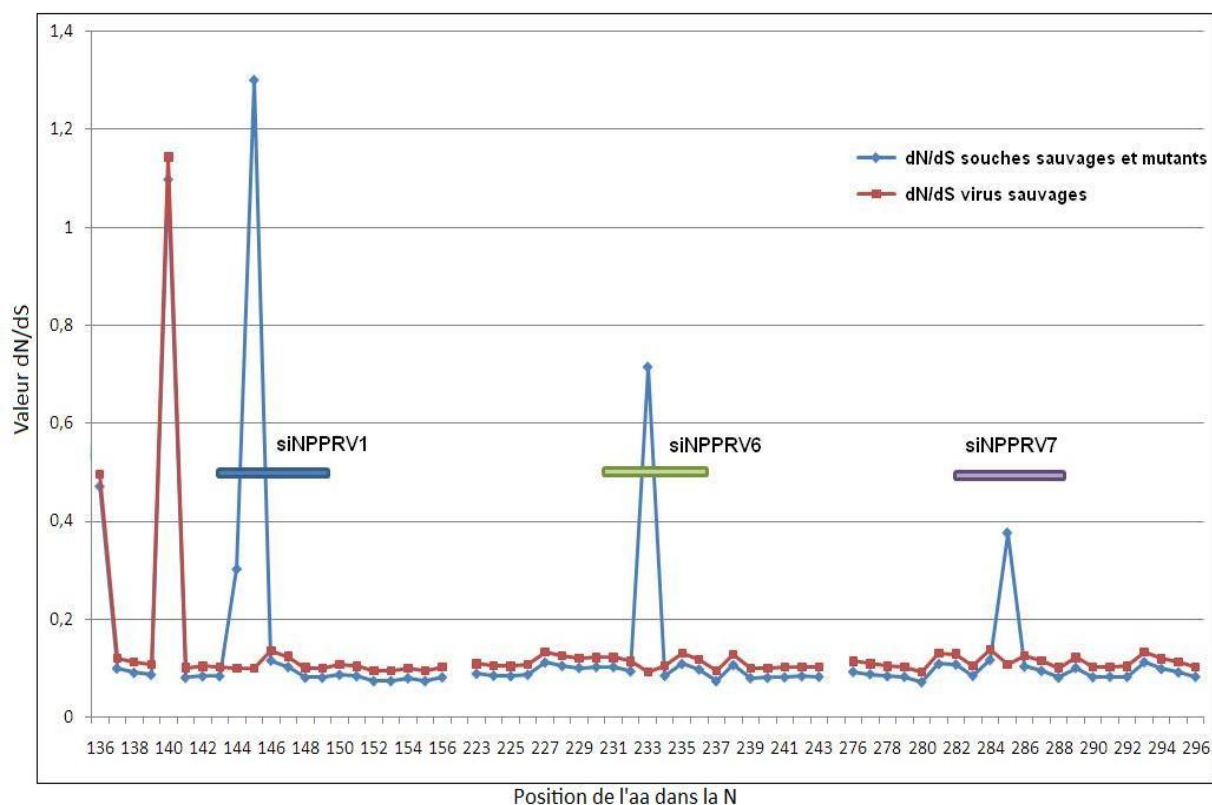
### 5.7.1 Analyse dN/dS

Pour vérifier si la conservation des zones cibles résulte d'un rôle structurel ou fonctionnel essentiel pour ces virus, une analyse dN/dS est effectuée (Figure 27). Le dN/dS représente le rapport entre le nombre de substitutions non-synonymes (dN) et les substitutions synonymes (dS) et fournit des informations sur la pression d'évolution sur un gène. Dans le cas des gènes essentiels, on s'attend à ce que le dS dépasse le dN ( $dN/dS < 1$ ) :

- $dN/dS < 1$ , sélection négative
- $dN/dS = 1$ , sélection neutre
- $dN/dS > 1$ , sélection positive (évolution adaptative)

Le ratio global du dN/dS du gène N du PPRV est  $0,144 \pm 0,189$  (min = 0,072 - max = 1,429). Ce ratio tombe à  $0,089 \pm 0,015$ ,  $0,095 \pm 0,013$  et  $0,096 \pm 0,013$  respectivement pour les positions du siNPPRV1, 6, et 7. Ces valeurs basses de dN/dS confirment l'existence d'une pression négative de sélection sur le gène N et en particulier dans les trois zones ciblées par les siARNs. Pour le MV, les valeurs correspondantes sont semblables :  $0,200 \pm 0,273$  (min = 0,061 - max=1,493) sur le gène N et,  $0,250 \pm 0,309$ ,  $0,116 \pm 0,097$  et  $0,091 \pm 0,023$  pour les siMV1, 6 et 7, respectivement. Quand les mutants d'échappement PPRV sont inclus dans l'analyse dN/dS, seulement une valeur dépasse un ( $dN/dS = 1,302 \pm 0,423$ ) à la position N<sub>145</sub> (A<sub>485</sub>A<sub>486</sub>C<sub>487</sub>) dans la région du siNPPRV1. Cela résulte de l'accumulation des mutations N/G<sub>145</sub>, N/S<sub>145</sub>, et N/T<sub>145</sub> observées dans le si1test1, le si1test4, et le si1\_mut\_test4 (Tableau 11). Toutefois, aucune des 13 positions (N<sub>145</sub> y compris) qui présentaient un ratio dN/dS > 1 dans le gène N n'est statistiquement reconnue comme des régions de pression de sélection positive (données non montrées).





**Figure 27.** Analyse dN/dS des souches sauvages du virus PPRV (en rouge) et des souches sauvages combinées avec les mutants d'échappements obtenus après transfections successives sous pression de sélection des siARN (bleu). Les régions correspondantes aux trois zones cibles sont indiquées en bleu, vert et violet pour le siNPPRV1, 6 et 7, respectivement.

### 5.7.2 Reconstruction phylogénétique (approche bayésienne) et horloge moléculaire

Une reconstruction phylogénétique par une approche bayésienne (Figure 28) a été effectuée pour déterminer si la vitesse d'évolution varie selon le traitement siARN. Les alignements multiples des séquences du gène N du PPRV retrouvés sur GenBank ou produites par notre équipe (Tableau 10) ont été utilisés. Cette reconstruction est ensuite utilisée pour une analyse d'horloge moléculaire avec PAML. La valeur estimée de mutations/site/année est de  $9,649 \times 10^{-4}$ . La valeur estimée de mutations/site/passage sous pression des siARNs est de  $69,9 \times 10^{-4}$ ,  $103,38 \times 10^{-4}$ ,  $115,79 \times 10^{-4}$ ,  $18,44 \times 10^{-4}$ , et  $< 8,77 \times 10^{-4}$  respectivement pour siNPPRV1, 6, 7, toute combinaison de deux siARNs, et l'association des trois siARNs. En d'autres termes, l'évolution moléculaire sous pression d'un seul siARN est sept à douze fois supérieure à la valeur de l'évolution moléculaire naturelle du PPRV et la combinaison de deux siARNs est deux fois supérieure.

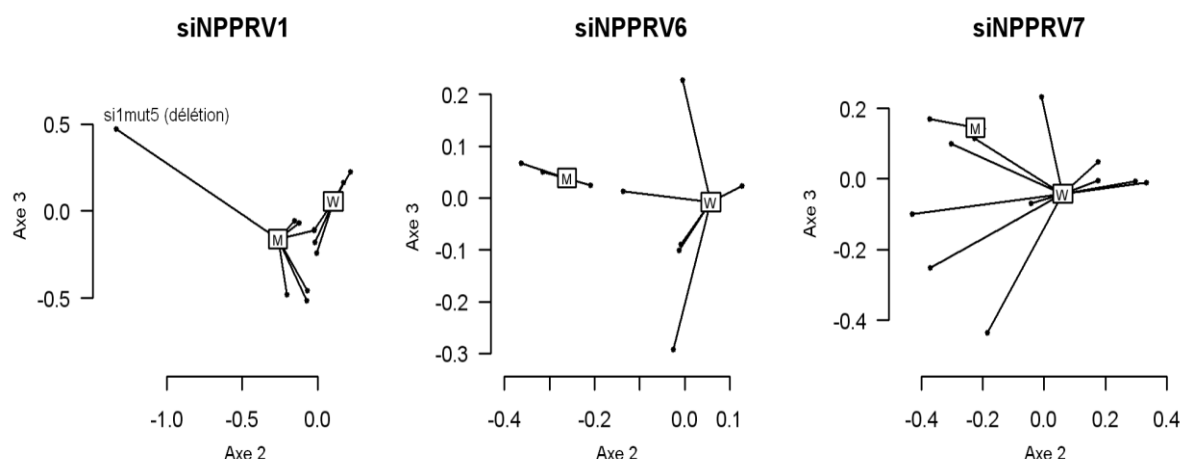


**Figure 28.** *Arbre de reconstruction phylogénétique obtenue par l'approche bayésienne.* L'arbre a été obtenu après alignements multiples des séquences du gène N du PPRV retrouvés sur GenBank ou produites par notre équipe.

### 5.7.3 Analyse factorielle multiple (AFM)

L'AFM est utilisée pour évaluer si la diversité des mutants siARNs se distingue de celle des variants naturels. Les mutations observées sur les zones cibles des siARNs sont comparées avec leurs régions flanquantes. Le système de score décrit dans la section «

Matériels et Méthodes » est appliqué pour n'importe quelle variation observée (dans la nature ou sur la souche Nigéria 75/1 exposée aux siARNs testés) dans les séquences d'acides nucléiques et d'acides aminés codés par ces acides nucléiques. Les résultats de l'AFM indiquent un niveau élevé de divergence entre les mutations observées dans la nature et celles induites après traitements avec les siARNs (Figure 29, test de permutation :  $p \leq 10^{-4}$ ).



**Figure 29. Groupes de PPRV sauvages (W) et mutants siARN-induits (M) selon leurs séquences nucléotidiques.** La distance entre les carrés M et W représente le niveau de divergence entre les séquences analysées. Le premier graphique présente l'analyse faite sur les séquences de la région cible du siNPPRV1, le deuxième sur la zone cible du siNPPRV6 et le troisième sur la zone cible du siNPPRV7.

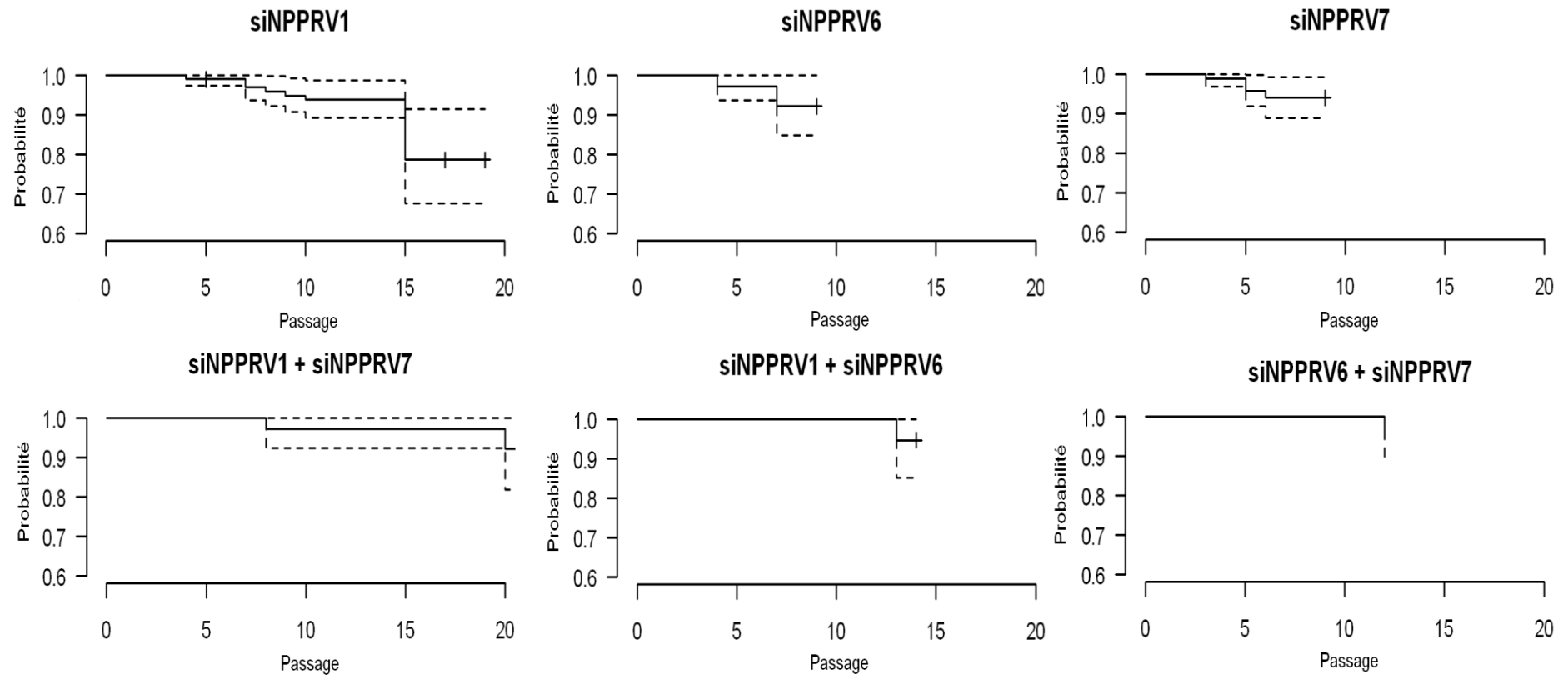
#### 5.7.4 Analyse de survie

Pour étudier si la vitesse d'échappement varie selon le traitement siARN, l'analyse de survie est utilisée à travers la comparaison de la probabilité d'apparition d'une mutation / délétion entre les transfections successives des différents groupes de traitement.

Les résultats de l'analyse de Kaplan-Meier sont présentés sur la Figure 40. Aucune mutation de la souche de PPRV vaccinale Nigéria 75/1 n'est rencontrée après 20 passages consécutifs pour la combinaison de trois siARNs (non représenté sur la Figure. 29). La probabilité de survie diminue à partir du 7<sup>e</sup> passage pour la combinaison de deux siARNs (trois derniers graphiques). En revanche, les mutations apparaissent plus rapidement et par

conséquent la probabilité de survie diminue plus vite (entre le 3<sup>e</sup> et le 10<sup>e</sup> passage) quand un seul siARN est appliqué (trois premiers graphiques).

Les résultats du modèle de Cox montrent que, par rapport au siNPRV1, le risque de mutation est plus élevé - mais pas significatif - pour le siNPPRV6 ( $RR = 2,5$ ,  $p = 0,11$ ) et pour le siNPPRV7 ( $RR = 2,1$ ,  $p = 0,13$ ). En outre, pour n'importe quelle combinaison de deux siARNs,  $RR$  est inférieur à un ( $RR < 1$ ). Cependant, la différence est significative pour l'association du siNPPRV6 avec le siNPPRV7 ( $RR = 0,2$ ,  $p = 7 \times 10^{-5}$ ).



**Figure 40. Probabilité de survie (ou d'absence de mutation) de la souche PPRV vaccinal Nigéria 75/1 sous pression de sélection exercée par différents siARNs.** Le nombre de transfections successives nécessaires à l'observation d'une mutation est employé comme temps de survie. La probabilité de survie est figurée par une ligne continue et son intervalle de confiance de 95% est représenté par les lignes à tirets.

## 6 DISCUSSION

La découverte de l'interférence ARN a suscité un intérêt majeur dans la communauté scientifique non seulement pour étudier la fonctionnalité des gènes par inhibition de leur expression, mais également comme un outil thérapeutique potentiel depuis que la production et l'application de courtes séquences d'ARN interférents synthétiques (les siARNs) ont été maîtrisées. Pouvoir développer des médicaments basés sur l'utilisation des siARNs est maintenant envisageable et représente une nouvelle perspective pharmacologique. Un intérêt majeur est concentré dans le développement des traitements pour diverses maladies infectieuses pour lesquelles une thérapie efficace n'est pas encore disponible. Bien que les vaccins puissent être des outils efficaces pour combattre les maladies virales, seules les drogues antivirales peuvent offrir une solution thérapeutique quand l'infection est déjà installée. De fait, les études explorant le développement des siARNs pour leur utilisation contre les maladies virales se sont multipliées. La stratégie de l'ARNi comme outil antiviral a été démontrée pour la première fois *in vitro* par Bitko and Barik (2001) pour contrôler la synthèse des protéines P et F et réduire la réplication du virus respiratoire syncytial. Depuis, une large gamme de virus s'est montrée sensible à l'ARNi *in vitro*, tels que le HIV (Boden et al., 2003 ; Das et al., 2004 ; Sabariego et al., 2006 ; Schopman et al., 2010), le coronavirus (McDonagh et al., 2011), l'influenza virus (Ge et al., 2003 ; Seth et al., 2010 ; Zhiqiang et al., 2010), le poliovirus (Gitlin et al., 2005 ; Saulnier et al., 2005), le virus de la fièvre aphteuse (Chen et al., 2006), le papillomavirus (Chen et al., 2010), le virus de la peste porcine africaine (Keita et al., 2010), les herpes virus (Bhuyan et al., 2004 ; Wiebusch et al., 2004 ; Chen et al., 2008), ainsi que les morbillivirus (Otaki et al., 2006 ; Reuter et al., 2006 ; Servan de Almeida et al., 2007 ; Keita et al., 2008). Même si la plupart des travaux ont été réalisés *in vitro*, des résultats prometteurs ont également été obtenus *in vivo* (Giladi et al., 2003 ; Tompkins et al., 2004 ; Bitko et al., 2005) et à ce jour, plusieurs essais cliniques sont en réalisation chez l'homme et chez les animaux (Haasnoot et al., 2007 ; Castanotto & Rossi, 2009). Cependant, le développement d'une thérapie antivirale basée sur l'interférence ARN relève encore des défis substantiels. Deux des contraintes les plus importantes sont (i) le développement des systèmes de délivrance efficaces *in vivo* (Xie et al., 2006 ; de Fougerolles, 2008 ; Takeshita et al., 2009) et (ii) le risque d'apparition des virus d'échappements résistants à l'ARNi (Das et al., 2004 ; Wu et al., 2005).

L'échappement à l'interférence ARN a été décrit auparavant, notamment pour des virus à ARN (Boden et al., 2003 ; Das et al., 2004 ; Gitlin et al., 2005 ; Westerhout et al., 2005 ; Wilson & Richardson, 2005 ; Wu et al., 2005 ; Konishi et al., 2006 ; Kusov et al.,

2006 ; Nishitsuji et al., 2006 ; Sabariego et al., 2006 ; ter Brake et al., 2006 ; Unwalla et al., 2006 ; Baba et al., 2008 ; von Eije et al., 2008). Une des principales caractéristiques de l'ARNi est l'exigence d'un haut degré de spécificité pour les séquences ciblées ce qui limite sa flexibilité vis-à-vis de la grande capacité d'évolution des virus. Effectivement, un seul point de mutation sur la zone cible peut entièrement annuler l'effet antiviral. Par conséquent, la résistance à l'ARNi peut être acquise par une seule mutation simple dans la zone cible ou en dehors, dans le cas d'un effet hors-cible (Gitlin et al., 2005 ; Westerhout et al., 2005 ; von Eije et al., 2008) et jusqu'à une délétion partielle ou complète (Westerhout et al., 2005). Les virus à ARN démontrent une propension élevée à acquérir une résistance aux siARNs en raison de leur taux d'erreurs élevé lors de la réplication de leur génome par l'ARN-polymérase ARN-dépendante (Nichol et al., 2000). Pour surmonter ce problème, différentes stratégies ont été proposées (ter Brake et al., 2006 ; Gitlin et al., 2005 ; Gimenez-Barcons et al., 2007 ; Schopman et al., 2010 ; Eekels et al., 2011). L'une d'entre elles, consiste à cibler un gène viral essentiel et conservé entre souches et entre virus d'une même famille pour essayer de limiter ainsi la capacité de dérive génétique du virus (Colbère-Garapin, et al., 2005 ; Shin et al., 2009).

Dans le but de développer une stratégie thérapeutique anti-morbillivirus, le Cirad a identifié trois ARN interférents (siNPPRV1, siNPPRV6 et siNPPRV7) capables d'inhiber *in vitro* à plus de 80% de la réplication du virus de la peste de petits ruminants, de la peste bovine et de la rougeole (Servan de Almeida et al., 2007 ; Keita et al., 2008). Parmi les six gènes codés par ces virus, le gène de la nucléoprotéine est le plus abondant et présente un rôle primordial dans l'encapsidation, la transcription et la réplication virale (Banyard et al., 2008). Vu la stabilité du génome des morbillivirus ( $6,2 \times 10^{-4}$  substitutions/site/année) relativement importante comparée aux autres virus ARN comme les entérovirus et les rétrovirus (respectivement  $34 \times 10^{-4}$  et  $25 \times 10^{-4}$  ; Jenkins et al., 2002) et le fait que les trois siARNs précédemment identifiés par le Cirad ciblent en outre la région la plus conservée du gène N (région III avec 85-90% de conservation de séquence entre morbillivirus), nous avons initialement présumé que la capacité des morbillivirus à échapper à la pression de siARNs serait limitée. Le but de cette étude était de vérifier cette hypothèse, en utilisant le virus de la PPR comme modèle de morbillivirus.

Dans le cadre de cette étude, des mutations/délétion dans la séquence d'un gène viral essentiel des morbillivirus ont été détectées après traitement *in vitro* avec des différentes doses de trois siARNs. Chacun des trois siARNs étudiés (siNPPRV1, siNPPRV6 et

siNPPRV7) utilisé seuls ou en combinaison a été capable d'induire des populations virales porteuses de mutations simples ou doubles (synonymes ou non-synonymes) ou d'une délétion de six acides nucléiques leur permettant d'échapper à la pression de sélection. Dans d'autres études, plusieurs virus ont également été capables de développer des variantes résistantes à l'ARNi par mutations ou délétions partielles ou complètes de la zone cible (Das et al., 2004 ; Westerhout et al., 2005). En conformité avec les résultats trouvés par Das et al. (2004) et par Sabariego et al. (2006) sur le HIV-1, une différence d'un seul acide nucléique entre le siARN et sa région cible est capable de modifier le niveau du *silencing* et de générer une résistance partielle à l'ARNi. Quant à la délétion, à notre connaissance, c'est la première fois qu'un mutant d'échappement est obtenu avec une délétion de six acides nucléiques dans un gène viral essentiel conservé. Ainsi, même pour le virus HIV-1 dont le génome est très plastique, von Eije et al. (2008) n'ont jamais obtenu de délétions parmi leurs 500 mutants d'échappement quand des séquences essentielles et hautement conservées étaient ciblées. Il est intéressant de noter, que la délétion observée dans le gène N du PPRV permet de maintenir la « règle des six » où le nombre de nucléotides composant le génome doit être un multiple de six pour une encapsidation optimale dans la nucléoprotéine et une réplication efficace du génome des morbillivirus (Halpin et al., 2004 ; Roux, 2005). Bien que la délétion soit en déphasage du cadre de lecture, elle n'aboutit, *in fine*, à la perte que de deux acides aminés, le reste de la protéine étant conservée à 100%. Le virus ainsi obtenu possède une protéine N plus courte, mais conservée à 99,62% par rapport à sa séquence d'origine. Ce résultat est une illustration d'une plasticité assez inattendue du génome des morbillivirus. Le niveau de résistance à l'ARNi a pu être corrélé à la quantité de divergence existant entre la zone cible et le siARN utilisé. La diminution de l'efficacité de l'ARNi s'est montrée plus prononcée dans les cas de délétion et de doubles mutations comparativement aux mutations simples, suggérant dans le premier cas, une meilleure réponse adaptative pour la résistance à l'interférence ARN.

Bien qu'une forte contrainte structurale ou fonctionnelle s'appliquait aux régions bien conservées du gène N viral ciblées par nos siARNs, nous n'avons cependant pas obtenu de réversion de mutation lorsqu'un second siARN muté (siNPPRV1mut4) a été appliqué à une première génération de mutants viraux d'échappement. Au contraire, une nouvelle mutation originale a été rapidement acquise, conférant une nouvelle résistance à l'ARNi.

Toutes les mutations observées, synonymes ou non-synonymes, ont été pour la plupart rencontrées dans les régions centrales ou dans les positions de l'extrémité 5' de la cible. Autrement dit, les modifications sont apparues entre les positions trois à dix et ont, le cas



échéant, abouti à des substitutions d'acides aminés entre les positions deux à quatre. La délétion a affecté la même région. Il a été déjà démontré qu'en fonction de la localisation des mutations dans la zone cible, une inhibition plus ou moins importante de l'interférence ARN pouvait se produire (Pusch et al., 2003). Les mutations dans la région centrale de la cible peuvent être responsables d'une plus grande résistance aux siARN, que celles rencontrés dans les extrémités 5' ou 3'. Les mutations dans l'extrémité 5' aboutiraient à une résistance partielle alors que les mutations dans l'extrémité 3' ne sembleraient pas affecter l'efficacité du *silencing* (Pusch et al., 2003 ; Gitlin et al., 2005 ; Sabariego et al., 2006). Nos résultats suggèrent que les régions critiques pour l'activité de nos siARNs se limiteraient à la première moitié des zones cibles (jusqu'au 10<sup>e</sup> nucléotide). En revanche, la deuxième moitié des régions cibles soit ne confère effectivement pas suffisamment de résistance à l'ARNi, soit ne peut pas être modifiée sans conséquences délétères sur la viabilité du virus.

Le faible degré de conservation de la région cible du siNPPRV7 explique qu'aucune des souches PPRV sauvages n'ait été efficacement contrôlée par le siNPPRV7. Des variations importantes entre ce siARN et les souches sauvages au niveau des positions quatre, neuf et douze de la cible sont présentes. Dans une visée thérapeutique, l'utilisation concomitante du siNPPRV7 d'origine et de siARNs « dégénérés », contenant les variations possibles de la séquence ciblée serait sûrement nécessaire pour contrôler l'ensemble des souches de PPRV présentes dans la nature. Une stratégie semblable a été utilisée par Schopman et al. (2010), où l'utilisation concomitante de trois siARNs couvrirait toutes les possibilités d'échappements du virus HIV-1. Ces siARNs ont été appelés siARN de seconde génération et ont été capables de bloquer les principales ressources d'échappement de ce virus.

Pour une grande proportion de mutants (8/18), la mutation induite par la pression des siARNs a entraîné des substitutions d'acides aminés (mutations non-synonymes). La majorité de ces substitutions (6/8) n'a probablement jamais existée à l'état naturel chez d'autres morbillivirus (analyse faite sur 343 séquences disponibles). Une telle malléabilité du gène N des morbillivirus était inattendue puisque l'analyse dN/dS sur la totalité du gène N de PPRV et de MV montrait des ratios inférieurs à 0,150, voire inférieurs à 0,1 pour les régions cibles de nos siARN, indiquant une forte pression de sélection négative. De façon plus surprenante, une position (A<sub>485</sub>A<sub>486</sub>C<sub>487</sub>/N<sub>145</sub>) dans la séquence cible du siNPPRV1 a obtenu une valeur dN/dS > 1. La raison pour laquelle des mutations non-synonymes ont été accumulées sur ces positions 485 à 487 de l'ARNm pour échapper à la pression exercée par le siARN pourrait être la conséquence d'une combinaison de facteurs comprenant : (i) le ciblage préférentiel de

ces résidus critiques pour échapper efficacement à l'interférence ARN, (ii) le nombre limité de codons alternatifs disponibles pour muter ces positions sans affecter l'acide aminé et (iii) la tolérance de la protéine N au changement de l'acide aminé concerné. Dans la mesure où les mutations d'acides nucléiques induites par nos trois siARNs se sont concentrées dans des régions des zones cibles qui disposent d'une dégénération limitée du code génétique, il n'est dès lors pas étonnant que presque la moitié de nos mutants d'échappement ait acquis une substitution d'acide aminé.

La variabilité génétique des virus ARN est bien connue et est directement liée à une fréquence de mutations relativement importante à chaque réplication du génome. Cela résulte de la fidélité imparfaite de l'enzyme responsable de la réplication, l'ARN-polymérase ARN-dépendante, qui ne possède pas de fonction de relecture et de réparation des erreurs. De cette façon, les virus ARN présentent des taux de mutations très élevés ( $10^{-3}$  à  $10^{-4}$  soit 1 nucléotide erroné pour 1 000 à 10 000 nucléotides copiés ; Jenkins et al., 2002 ; Hanada et al., 2004). Cette fréquence d'erreur est par exemple très supérieure à celle observée pour les virus ADN ( $10^{-6}$  à  $10^{-9}$ , soit un nucléotide erroné pour un million à un milliard de nucléotides copiés ; Drake et al., 1998). Cette variabilité présente cependant un avantage adaptatif et évolutif certain pour échapper aux défenses de l'hôte, mais également pour acquérir des résistances aux antiviraux. L'apparition de virus mutants résistants est une des raisons invoquées pour expliquer l'échec d'un traitement antiviral, en particulier lorsque celui-ci n'est pas suffisamment efficace ou est mal appliqué (dose et durée inadaptées). En effet, face à la pression de sélection d'un traitement inapproprié, l'évolution des virus peut être très rapide. Notre travail confirme cette situation puisque le taux de mutations par emplacement et par passage sous pression de sélection d'un seul siRNA a été sept à douze fois plus élevés que les taux de mutation/emplacement/année des souches sauvages de morbillivirus évoluant normalement dans le milieu naturel. Ce taux n'était plus que deux fois plus élevé lorsqu'une combinaison de deux siARNs était utilisée.

Pour limiter ces risques d'acquisition de résistance, des stratégies doivent être envisagées. Quelques unes pourraient être de : (i) débiter les traitements le plus tôt possible, lorsque la charge virale est encore peu élevée et que la fréquence d'acquisition de mutants résistants est plus faible ; (ii) commencer avec un traitement combinant plusieurs molécules, pour ne pas donner au virus la possibilité de développer des résistances de manière séquentielle. Dans notre étude nous avons été capables de réduire le taux d'évolution *in vitro* à la valeur correspondante observée dans la nature en associant trois siRNA puisque aucune

mutation n'a été observée au bout de 20 passages. Selon nos résultats, l'utilisation thérapeutique d'une combinaison d'au moins deux siARN à concentration optimale doit être recommandée contre des morbillivirus. Dans cette étude, l'apparition des mutants d'échappement a en effet été retardée de six à treize passages quand deux siARNs ont été associés et l'utilisation de trois siARNs a empêché l'émergence de mutants d'échappement après 20 traitements successifs. Un résultat similaire a été obtenu par Kusov et al. (2006), qui ont pu empêcher l'apparition des variantes du HIV-1 résistantes à l'ARNi quand plusieurs régions d'un gène non-structural ont été ciblées. Ces résultats soulignent que l'utilisation adéquate de l'ARNi pourrait être une solution thérapeutique intéressante. Toutefois, ils montrent aussi qu'une erreur de conception du traitement et de dose, pourrait accélérer l'évolution et générer l'émergence de souches avec des modifications potentiellement « dangereuses » aboutissant par exemple à l'émergence de phénotypes plus virulents. Il est important de souligner également, que l'apparition de mutants d'échappement est probablement plus fréquente dans un contexte expérimental qu' *in vivo*. En effet, les cellules Vero ne produisent pas de IFN-1 et les virus peuvent se multiplier plus facilement.

## 7 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le laboratoire de virologie du Cirad, référence nationale et internationale pour la PPR, a engagé des travaux sur l'interférence ARN dès 2004 pour lutter contre les infections à morbillivirus. Le premier objectif consistait à identifier des siARNs actifs *in vitro* sur plusieurs morbillivirus. Parmi les six gènes codés par ces virus, le gène codant pour la nucléoprotéine virale a été initialement choisi. Outre le fait que ce gène soit le plus abondant dans les virions et dans les cellules infectées, il présente un rôle primordial dans l'encapsidation, la transcription et la réplication virale (Banyard et al., 2008). Des régions conservées de la N virale ont été identifiées et soumises à sélection de séquences siARN actives. Trois sites conservés ont été identifiés comme peuvent être efficacement ciblés *in vitro* par des siARNs spécifiques de trois morbillivirus différents. Ces trois sites permettent d'inhiber *in vitro* de manière quasi complète la réplication du virus de la rougeole, de la peste bovine et de la peste des petits ruminants. Le présent travail nous a permis de montrer la grande malléabilité des réponses adaptatives des morbillivirus face aux traitements par ses trois siARNs qui ciblent pourtant des régions essentielles et hautement conservées du génome viral. L'exemple le plus flagrant de cette malléabilité est la délétion de six acides nucléiques en déphasage du cadre de lecture, obtenu après 15 transfections successives *in vitro* avec le siNPPRV1. A notre connaissance, c'est la première fois qu'un virus d'échappement est obtenu avec une délétion de six acides nucléiques dans un gène viral essentiel et fortement conservé, ayant comme résultat l'expression d'une protéine plus courte. Pour l'heure, seul le VHC a montré une capacité à échapper à l'ARNi à travers la délétion d'un seul acide nucléique dans la zone cible quant une protéine structural a été ciblée (Konishi et al., 2006). Le HIV-1 semble seulement être capable de déléter des régions des gènes non-structuraux (Westerhout et al., 2005). Nos résultats démontrent qu'il existe un obstacle critique à l'utilisation de l'ARNi comme thérapie anti-morbillivirus, dû à la plasticité génomique de ces virus. Cependant, nous avons été capables d'empêcher l'apparition *in vitro* de virus d'échappement après 20 transfections successives en utilisant une combinaison de trois siARNs, ce qui pourrait être une stratégie alternative acceptable pour diminuer le risque d'échec des traitements avec des siARNs.

Une fois contenu le risque d'échappement comme proposé dans ce travail, il convient de se pencher sur la question de la délivrance efficace des siARN *in vivo*. Cette question n'est pas simple car les siARN sont exposés aux ARNases de l'organisme et doivent *in fine* accéder aux cellules dans lesquelles se répliquent les virus. Les efforts de recherche du laboratoire de

virologie du Cirad se concentrent maintenant sur cette question. Un premier essai de délivrance de siARN par des liposomes ou un adénovirus réalisé chez la chèvre en 2006 n'a pas permis de montrer des effets significatifs. Pour perfectionner les systèmes de délivrance, l'équipe s'est alors engagée dans le développement d'un modèle souris, plus économique et reproductible. Dans un premier temps, un modèle non infectieux a été établi. Il consiste à faire exprimer chez la souris le gène de la luciférase contenant une séquence cible de siARN dérivée des morbillivirus. L'extinction du gène par délivrance de siARN sous différentes formes est alors mesurée de façon dynamique au cours du temps par imagerie *in vivo*. A travers ce système, trois candidats potentiels pour la délivrance *in vivo* des siARNs ont été sélectionnés : un vecteur baculovirus, un peptide et une préparation lipidique. Ces systèmes de délivrance sont actuellement en cours d'analyse, mais pour l'instant aucun n'a induit des effets significatifs. Dans un second temps, le développement d'un modèle infectieux a été engagé consistant à produire une souris transgénique exprimant le récepteur cellulaire du virus PPR. Cette souris sera croisée avec une souris immunodéprimée pour rendre les issues sensibles à l'infection PPR. L'efficacité des systèmes de délivrance ainsi que de l'application de différentes associations de siARNs pourront alors être testées avant d'être validées chez l'espèce cible, la chèvre.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abraham, G.; Berhan, A. (2001). The use of antigen – capture enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants in Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, 33(5):423-430.
- Abubakar, M.; Khan, H.A.; Arshed, M.J.; Hussain, M.; Ali, Q. (2011). Peste des petits ruminants (PPR): Disease appraisal with global and Pakistan perspective. *Small Ruminant Research*, 96:1-10.
- Adombi, C.M.; Lelenta, M.; Lamien, C.E.; Shamaki, D.; Koffi, Y.M.; Traoré, A.; Silber, R.; Couacy-Hymann, E.; Bodjo, S.C.; Djaman, J.A.; Luckins, A.G.; Diallo, A. (2011). Monkey CV1 cell line expressing the sheep-goat SLAM protein: a highly sensitive cell line for the isolation of peste des petits ruminants virus from pathological specimens. *Journal of Virological Methods*, 173(2):306-313.
- Amarzguioui, M.; Prydz, H. (2004). An algorithm for selection of functional siRNA sequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316:1050-1058.
- An, D.S.; Qin, F.X.-F.; Auyeung, V.C.; Mao, S.H.; Kung, S.K.P.; Baltimore, D.; Chen, I.S.Y. (2006). Optimization and functional effects of stable short hairpin RNA expression in primary human lymphocytes via lentiviral vectors. *Molecular Therapy*, 14(4):494-504.
- Anderson, J.; Corteyn, M.; Libeau, G. (2006). Diagnosis of rinderpest virus and peste des petits ruminants virus. In: *Rinderpest and peste des petits ruminants*. Barrett, T.; Pastoret, P.P.; Taylor, W.P. (editors), Oxford: Elsevier, p. 13-30.
- Appel, M.J.; Gillespie, J.H. (1972). Canine distemper virus. In: *Virology Monographs* 11. Gard, S.; Hallauer, C.; Meyer, K.F. (editors), New York: Springer Verlag, p. 1-96.
- Appel, M.J.; Summers, B.A. (1995). Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Veterinary Microbiology*, 44:187–191.
- Arns, C.W.; Spilki, F.R.; Servan de Almeida, R. (2007). Paramyxoviridae. In: *Virologia veterinaria*. Flores, E.F. (org.), Santa Maria: Editora UFSM, p. 657-688.
- Ayari-Fakhfakh, E.; Ghram, A.; Bouattour, A.; Larbi, I.; Gribâa-Dridi, L.; Kwiatak, O.; Bouloy, M.; Libeau, G.; Albina, E.; Cêtre-Sossah, C. (2011). First serological

investigation of peste-des-petits-ruminants and Rift Valley fever in Tunisia. *The Veterinary Journal*, 187:402-404.

Axtell, M.J.; Jan, C.; Rajagopalan, R.; Bartel, D.P. (2006). A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plant. *Cell*, 127:565-577.

Baba, K.; Goto-Koshino, Y.; Mizukoshi, F.; Setoguchi-Mukai, A.; Fujino, Y.; Ohno, K.; Tsujimoto, H. (2008). Inhibition of the replication of feline immunodeficiency virus by lentiviral vector-mediated RNA interference in feline cell lines. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 70(8):777-783.

Bailey, D.; Banyard, A.C.; Dash, P.; Ozkul, A.; Barrett, T. (2005). Full genome sequence of peste des petits ruminants virus (PPRV): promoter and protein specificities. *Virus Research*, 110:119-124.

Banerjea, A.; Li, M.J.; Bauer, G.; Remling, L.; Lee, N.S.; Rossi, J.; Akkina, R. (2003). Inhibition of HIV-1 by lentiviral vector-transduced siRNAs in T lymphocytes differentiated in SCID-hu mice and CD34+ progenitor cell-derived macrophages. *Molecular Therapy*, 8(1):62-71.

Bankamp, B.; Horikami, S.M.; Thompson, P.D.; Huber, M.; Billeter, M.; Moyer, S.A. (1996). Domains of the measles virus N-protein required for binding to P-protein and self-assembly. *Virology*, 216:272-277.

Banyard, A.C.; Grant, R.J.; Romero, C.H.; Barrett, T. (2008). Sequence of the nucleocapsid gene and genome and antigenome promoters for an isolate of porpoise morbillivirus. *Virus Research*, 132:213-219.

Banyard, A.C.; Parida, S.; Batten, C.; Oura, C.; Kwiatak, O.; Libeau, G. (2010). Global distribution of peste des petits ruminants virus and prospects for improved diagnosis and control. *Journal of General Virology*, 91(12):2885-97.

Banyard, A.C.; Rima, B.K.; Barrett, T. (2006). The morbillivirus. In: *Rinderpest and peste des petits ruminants*. Barrett, T.; Pastoret, P.P.; Taylor, W.P. (editors), Oxford: Elsevier, p. 13-30.

Barclay, A.J.; Foster, A.; Sommer, A. (1987). Vitamin A supplements and mortality related to measles: a randomised clinical trial. *British Medical Journal*, 294(6567):294-296.

Baron, M.D.; Barrett, T. (2000). Rinderpest viruses lacking the C and V proteins show specific defects in growth and transcription of viral RNAs. *Journal of Virology*, 74:2603-11.

Baron, M.D.; Barrett, T. (1995). Sequencing and analysis of the nucleocapsid (N) and polymerase (L) genes and the extragenic domains of the vaccine strain of rinderpest virus. *Journal of General Virology*, 76: 593-603.

Barrett, T.; Banyard, A.C.; Diallo, A. (2005). The molecular biology of the morbilliviruses. In: *Rinderpest and peste des petits ruminants, virus plagues of large and small ruminants*. Barrett, T.; Pastoret, P.-P.; Taylor, W.P. (editors), Amsterdam: Academic Press, Elsevier, p. 31–67.

Barrett, T. (1999). Morbillivirus infection, with special emphasis on morbillivirus of carnivores. *Veterinary Microbiology*, 69:3-13.

Barrett, T.; Subbarao, S.M.; Belsham, G.J.; Mahy, B.W.J. (1991). The molecular biology of the morbilliviruses, In: *The paramyxoviruses*. Kingsbury, D.W. (ed.), New York: Plenum Press, p. 83-102.

Bellini, W.J.; Englund, G., Rozenblatt, S.; Arnheiter, H.; Richardson, C.D. (1985). Measles virus P gene codes for two proteins. *Journal of Virology*, 53:908-919.

Benasser, Y.; Le, S.Y.; Benkirane, M.; Jeang, K.T. (2005). Evidence that HIV-1 encodes an siRNA and a supressor of RNA silencing. *Immunity*, 22:607-619.

Bernstein, E.; Caudy, A.A.; Hammond, S.M.; Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409:363-366.

Bhuyan, P.K.; Kariko, K.; Capodici, J.; Lubinski, J.; Hook, L.M.; Friedman, H.M.; Weissman, D. (2004). Short interfering RNA-mediated inhibition of herpes simplex virus type 1 gene expression and function during infection of human keratinocytes. *The Journal of Virology*, 78(19):10276-10281.

Birmingham, A.; Anderson, E.M.; Reynolds, A.; Ilsley-Tyree, D.; Leake, D.; Fedorov, Y.; Baskerville, S.; Maksimova, E.; Robinson, K.; Karpilow, J.; Marshall, W.S.; Khvorova, A. (2006). 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nature Methods*, 3(3):199-204.



Bitko, V.; Barik, S. (2001). Phenotypic silencing of cytoplasmatic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses. *BMC Microbiology*, 1:34.

Bitko, V.; Musiyenko, A.; Shulyayeva, O.; Barik, S. (2005). Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nature Medicine*, 11:50-55.

Black, F.L.; Rosen, L. (1962). Patterns of measles antibodies in residents of Tahiti and their stability in absence of re-exposure. *Journal of Immunology*, 88:725-731.

Boden, D.; Pusch, O.; Lee, F.; Tucker, L.; Ramratnam, B. (2003). Human immunodeficiency virus type 1 escape from RNA interference. *The Journal of Virology*, 77:11531–11535.

Bohula, E.A.; Salisbury, A.J.; Sohail, M.; Playford, M.P.; Riedemann, J.; Southern, E.M.; Macaulay, V.M. (2003). The efficacy of small interfering RNAs targeted to the type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF1R) is influenced by secondary structure in the IGF1R transcript. *The Journal of Biological Chemistry*, 278:15991-15997.

Bourdin, P.; Rioche, M.; Laurent, A. (1970). Emploi d'un vaccin anti-bovine pestique produit sur cultures cellulaires dans la prophylaxie de la peste des petits ruminants au Dahomey. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 23:295-300.

Bourhis, J.M.; Jahasson, K.; Receveur-Brechot, V.; Oldfield, C.J.; Dunker, K.A.; Canard, B.; Longhi, S. (2004). The C-terminal domain of measles virus nucleoprotein belongs to the class of intrinsically disordered proteins that fold upon binding to their physiological partner. *Virus Research*, 99:157-167.

Boyd, S.D. (2008). Everything you wanted to know about small RNA but were afraid ask. *Laboratory Investigation*, 88:569-578.

Boxer, E.L.; Nanda, S.K.; Baron, M.D. (2009). The rinderpest virus non-structural C protein blocks the induction of type 1 interferon. *Virology*, 385:134-142.

Braasch, D.A.; Paroo, Z.; Constantinescu, A.; Ren, G.; Oz, O.K.; Mason, R.P.; Corey, D.R. (2004). Biodistribution of phosphodiester and phosphorothioate siRNA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14(5):1139-1143.

- Brown, C.C.; Mariner, J.C.; Olander, H.J. (1991). An immuno-histochemical study of the pneumonia caused by peste des petits ruminants virus. *Veterinary Pathology*, 28:166-170.
- Brown, C.C.; Torres, A. (1994). Distribution of antigen in cattle infected with rinderpest virus. *Veterinary Pathology*, 31:194-200.
- Bundza, A.; Afshar, A.; Dukes, T.W.; Myers, D.J.; Dulac Susi, G.; Becker, A.W.E. (1988). Experimental peste des petits ruminants (goat plague) in Goats and sheep. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 52:46-52.
- Caplen, N.J.; Mousses, S. (2003). Short interfering RNA (siRNA)-mediated RNA interference (RNAi) in human cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1002:56-62.
- Carmichael, G.G. (2002). Medicine: silencing viruses with RNA. *Nature*, 418:379–380.
- Carter, B.J. (2005). Adeno-associated virus vectors in clinical trials. *Human Gene Therapy*, 16(5):541-550.
- Castanotto, D.; Rossi, J.J. (2009). The promises and pitfalls of RNA interference-based therapeutics. *Nature*, 457:426-433.
- Chalk, A.M.; Wahlestedt, C.; Sonnhammer, E.L. (2004). Improved and automated prediction of effective siRNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319(1):264-274.
- Chauhan, H.C.; Chandel, B.S.; Kher, H.N.; Dadawala, A.I.; Agrawal, S.M. (2009). Pesti des petits ruminants virus infection in animals. *Veterinary World*, 2(4):150-155.
- Chen, M.; Payne, W.S.; Hunt, H.; Zhang, H.; Holmen, S.L.; Dodgson, J.B. (2008). Inhibition of Marek's disease virus replication by retroviral vector-based RNA interference. *Virology*, 377:265-272.
- Chen, W.; Liu, M.; Jiao, Y.; Yan, W.; Wei, X.; Chen, J.; Fei, L.; Liu, Y.; Zuo, X.; Yang, F.; Lu, Y.; Zheng, Z. (2006). Adenovirus-mediated RNA interference against foot-and-mouth disease virus infection both *in vitro* and *in vivo*. *The Journal of Virology*, 80(7):3559-3566.

- Chen, X.Z.; Zhu, K.J.; Xu, Y.; Tang, X.Y.; Cai, X.Z.; Zhang, X.; Cheng, H. (2010). RNA interference silences the human papillomavirus 6b/11 early gene E7 *in vitro* and *in vivo*. *Clinical and Experimental Dermatology*, 35(5):509-515.
- Chen, Z.; Krug, R.M. (2000). Selective nuclear export of viral mRNAs in influenza-virus infected cells. *Trends of Microbiology*, 8:376-383.
- Choppin, P.; Scheid, A. (1980). The role of viral glycoproteins in adsorption, penetration and pathogenicity of viruses. *Reviews of Infectious Diseases*, 2:40-61.
- Cogoni, C.; Irelan, J.T.; Schumacher, M.; Schmidhauser, T.J.; Selker, E.U.; Macino, G. (1996). Transgene silencing of the *al. 1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *EMBO Journal*, 15:3153-63.
- Cogoni, C.; Macino, G. (1997). Isolation of quelling defective (*qde*) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94:10238-338.
- Colbère-Garapin, F.; Blondel, B.; Saulnier, A.; Pelletier, I.; Labadie, K. (2005). Silencing viruses by RNA interference. *Microbes and Infection*, 7:767-775.
- Conzelmann, K.K. (2004). Reverse genetics of mononegavirales. In: *Biology of negative strand RNA viruses: the power of reverse genetics*. Kawaoka, Y. (ed.), Springer, p. 1-41.
- Coronel, E.C.; Takimoto, T.; Murti, K.G.; Varich, N.; Portner, A. (2001). Nucleocapsid incorporation into parainfluenza virus is regulated by specific interaction with matrix protein. *The Journal of Virology*, 75:1117-1123.
- Cosby, S.L.; Kai, C.; Yamanouchi, K. (2005). Immunology of rinderpest- an immunosuppression but a lifelong vaccine protection. Rinderpest and peste des petits ruminants. Virus plagues of large and small ruminants. In: Barrett, T.; Pastoret, P.-P.; Taylor, W.P. (editors), Amsterdam: Academic Press, Elsevier, p. 197–221.
- Couacy-Hymann, E.; Bidgeh, K.; Angba, A.; Domenech, J.; Diallo, A. (1995). Protection of goats against rinderpest by vaccination with attenuated peste des petits ruminants virus. *Research in Veterinary Science*, 59:106–9.

- Couacy-Hymann, E.; Roger, F.; Hurard, C.; Guillou, J.P.; Libeau, G.; Diallo, A. (2002). Rapid and sensitive detection of peste des petits ruminants virus by a polymerase chain reaction assay. *Journal of Virological Methods*, 100:17–25.
- Cox, D.R.; Oakes, D. (1984). *Analysis of survival data (monographs on statistics and applied probability 21)*. London: Chapman & Hall/CRC Press, 208 p.
- Cruz, C.D.; Palosaari, H.; Parisien, J.P.; Devaux, P.; Cattaneo, R.; Ouchi, T.; Horvath, C.M. (2006). Measles virus V protein inhibits P53 family member P73. *Journal of Virology*, 80(11):5644-5650.
- Curran, J.A.; Kolakofsky, D. (1991). Rescue of a Sendai virus DI genome by other parainfluenza viruses : Implications for genome replication. *Virology*, 182:168-176.
- Curran, J.; Marq, J.B.; Kolakofsky, D. (1995). An N-terminal domain of the Sendai paramyxovirus P protein acts as a chaperone for the NP protein during the nascent chain assembly step of genome replication. *The Journal of Virology*, 69:849-855.
- Curran, J.; Pelet, T.; Kolakofsky, D. (1994). An acidic activation-like domain of the sendai virus P protein is required for RNA synthesis and encapsidation. *Virology*, 202:875-884.
- Curran, J. (1996). Reexamination of the sendai virus P protein domains required for RNA synthesis: a possible supplemental role for the P protein. *Virology*, 221:130-140.
- Dallas, A.; Vlassov, A.V. (2006). RNAi: a novel antisense technology and its therapeutic potential. *Medical Science Monitor*, 12(4):67-74.
- Das, A.T.; Brummelkamp, T.R.; Westerhout, E.M.; Vink, M.; Madiredjo, M.; Bearnrds, R.; Berkhout, B. (2004). Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition. *The Journal of Virology*, 78(5):2601-2605.
- Davidson, B.L.; McCray Jr., P.B. (2011). Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nature Reviews*, 12:329-340.
- de Fougerolles, A.R. (2008). Delivery vehicles for small interfering RNA in vivo. *Hum Gene Therapy*, 19:125-132.

DeFranco, A.; Robertson, M.; Locksley, R. (2009). *Immunité : La réponse immunitaire dans les maladies infectieuses et inflammatoires*. France: De Boeck (ed.), 365 p.

Delenda, C.; Taylor, G.; Hausmann, S.; Garcin, D.; Kolakofsky, D. (1998). Sendai viruses with altered P, V, and W protein expression. *Virology*, 242:327-337.

de Quadros, C.A.; Izurieta, H.; Carrasco, P. ; Brana, M.; Tambini, G. (2003). Progress toward measles eradication in the region of the americas. *Journal of Infectious Diseases*, 187:102-110.

de Swart, R.L. (2008). The pathogenesis of measles revisited. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 27(10):84-88.

Diallo, A.; Barrett, T.; Barbron, M.; Meyer, G.; Lefèvre, P.C. (1994). Cloning of the nucleocapsid protein gene of peste des petits ruminants virus: relationship to other morbilliviruses. *Journal of General Virology*, 75:233-237.

Diallo, A.; Barret, T.; Lefèvre, P.C.; Taylor, W. P. (1987). Comparison of proteins induced in cells infected with RP and PPR viruses. *Journal of General Virology*, 68:2033-2038.

Diallo, A. (2003c). Control of peste des petits ruminants : classical and new generation vaccines. *Developmental Biology*, 114:113-119.

Diallo, A. (2006). Control of peste des petits ruminants and poverty alleviation ? *Journal compilation, Journal of Veterinary Medicine B*, 53(1):11-13.

Diallo, A.; Minet, C.; Le Goff, C.; Berhe, G.; Albina, E.; Libeau, G.; Barrett, T. (2007). The threat of peste des petits ruminants: progress in vaccine development for disease control. *Vaccine*, 25:5591-5597.

Diallo, A. (1990). Morbillivirus group: genome organisation and proteins. *Veterinary Microbiology*, 23:155-163.

Diallo, A. (2003a). Morbillivirus. In : *Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail. Europe et régions chaudes*. Lefèvre, P.C.; Blancou, J.; Chermette, R., Paris: Tec & Doc. (editor), p. 279-283.

Diallo, A. (2005). Peste des petits ruminants. In : Guide pratique de diagnostic et de gestion des epizooties. Paris: Direction Générale de l'alimentation (DGAI), p. 143-154.

Diallo, A. (2003b). Peste des petits ruminants. In : Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail. Europe et régions chaudes. Lefèvre, P.C.; Blancou, J.; Chermette, R., Paris: Tec & Doc. (editor), p. 307-322.

Diallo, A.; Taylor, W.P.; Lefèvre, P.C.; Provost, A. (1989). Attenuation d'une souche de virus de la peste des petits ruminants: candidat pour un vaccin homologue. *Revue d'Elevage et de Medecine Veterinaire des Pays Tropicaux*, 42:311-7.

Diallo, A. (2004). Vaccination for the control of peste de petits ruminants. In: Control of infectious animal diseases by vaccination. Schudel, A.; Lombard, M. (eds), *Dev. Biol. Basel*, 119: p. 93-98.

Ding, S.W.; Li, H.; Lu, R.; Li, F.; Li, W.X. (2004). RNA silencing: a conserved antiviral immunity of plants and animals. *Virus Research*, 102:109-115.

Drake, J.W.; Charlesworth, B.; Charlesworth, D.; Crow, J.F. (1998). Rates of spontaneous mutation. *Genetics*, 148(4):1667-1686.

Drummond, A.J.; Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7:214.

Dufour, L.; Dufour, B.; Libeau, G.; Diallo, A. (2009). Le point sur l'epizootie de peste des petits ruminants au Maroc, en 2008. *Epidémiologie et Santé Animal*, 56:243-248.

Dufour, L. (2010). La peste des petits ruminants: epizootie marocaine de 2008, un danger pour l'Europe ? Thèse Vétérinaire, Faculté de Medecine de Creteil, Creteil, 152 p.

Eekels, J.J.M.; Geerts, D.; Jeeninga, R.E.; Berkhout, B. (2011). Long-term inhibition of HIV-1 replication with RNA interference against cellular co-factors. *Antiviral Research*, 89:43-53.

Elbashir, S.M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T. (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411:494-498.

- Elbashir, S.M.; Martinez, J.; Patkaniowska, A.; Lendeckel, W.; Tuschl, T. (2001b). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO Journal*, 20:6877–6888.
- El Hag Ali, B.; Taylor, W.P. (1984). Isolation of peste des petits ruminants virus from Sudan. *Research in Veterinary Science*, 36:1–4.
- Elzein, E.M.; Housawi, F.M.; Bashareek, Y.; Gameel, A.A.; Al-Afalet, A.I.; Anderson, E. (2004). Severe PPR infection in gazelles kept under semi-free range conditions. *Journal of Veterinary Medicine*, 51:68-71.
- Erlenhofer, C.; Duprex, W.P.; Rima, B.K. (2002). Analysis of receptor (CD46, CD150) usage by measles virus. *Journal of General Virology*, 83:1431-1436.
- Escofier, B.; Pagès, J. (1994). Multiple factor analysis (AFMULT package). *Computational Statistics & Data Analysis*, 18:121-140.
- Escoffier, C.; Manie, S.; Vincent, S.; Muller, C.P.; Billeter, M.; Gerlier, D. (1999). Nonstructural C protein is required for efficient measles virus replication in human peripheral blood cells. *Journal of Virology*, 73:1695-8.
- Ezeibe, M.C.O.; Okoroafor, O.N.; Ngene, A.A.; Eze, J.I.; Ugonabo, J.A.C. (2008). Persistent detection of peste des petits ruminants antigen in the faeces of recovered goats. *Tropical Animal Health and Production*, 40:517-519.
- Far, R.K.K.; Sczakiel, G. (2003). The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*, 31(15):4417-4424.
- Feng, Z.; Jiang, P.; Wang, X.; Li, Y.; Jiang, W. (2008). Adenovirus-mediated shRNA interference against porcine circovirus type 2 replication both *in vitro* and *in vivo*. *Antiviral Research*, 77(3):186-194.
- Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M.K.; Kostas, S.A.; Driver, S.E.; Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391:806-811.
- Fischer, D.; Bieber, T.; Li, Y.; Elsassner, H.P.; Kissel, T. (1999). A novel non viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine:

effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharmaceutical Research*, 16(8):1273-1279.

Forsyth, M.A.; Barrett, T. (1995). Evaluation of polymerase chain reaction for the detection and characterisation of rinderpest and peste des petits ruminants viruses for epidemiological studies. *Virus Research*, 39:151-163.

Furley C.W.; Taylor W.P.; Obi T.U. (1987). An outbreak of peste des petits ruminants in a zoological collection. *Veterinary Record*, 121:443–447.

Furuse, Y.; Suzuki, A.; Oshitani, H. (2010). Origin of measles virus: divergence from rinderpest virus between the 11th and 12th centuries. *Virology Journal*, 7:52.

Galtier, N.; Gouy, M.; Gautier, C. (1996). SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Computer Applications in the Biosciences*, 12:543-548.

Gargadennec, L.; Lalanne, A. (1942). La peste des petits ruminants. *Bulletin des Services Zootechniques et des Epizooties de l'Afrique*, 5:16–21.

Ge, Q.; McManus, M.T.; Nguyen, T.; Shen, C.H.; Sharp, P.A.; Eisen, H.N.; Chen, J. (2003). RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100:2718–2723.

Gerlier, D.; Plumet, S.; Herschke, F. (2007). Dynamique de l'RNAome du virus de la rougeole. *Virologie*, 11(3):231-245.

Gibbs, E.P.J.; Taylor, W.P.; Lawman, M.P.J.; Bryant, J. (1979). Classification of peste des petits ruminants virus as the fourth member of the Genus Morbillivirus. *Intervirology*, 11:268–74.

Giladi, H.; Ketzin-el-Gilad, M.; Rivkin, L.; Felig, Y.; Nussbaum, O.; Galun, E. (2003). Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Molecular Therapy*, 8:769-776.

Gilbert, Y.; Monnier, J. (1962). Adaptation d'une souche de virus bovipestique à la culture cellulaire. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 15(4):311-320.



- Jimenez-Barcons, M.; Clotet, B.; Martinez, M.A. (2007). Endoribonuclease-prepared short interfering RNAs induce effective and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication. *The Journal of Virology*, 81(19):10680-10686.
- Gitlin, L.; Karelsky, S.; Andino, R. (2002). Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature*, 418:430–434.
- Gitlin, L.; Stone, J.K.; Andino, R. (2005). Poliovirus escape from RNA interference: short interfering RNA-target recognition and implications for therapeutic approaches. *The Journal of Virology*, 79(2):1027-1035.
- Gotoh, B.; Komatsu, T.; Takeuchi, K.; Yokoo, J. (2001). Paramyxovirus accessory proteins as interferon antagonists. *Microbiology and Immunology*, 45:787-800.
- Gottwein, E.; Mukherjee, N.; Sachse, C.; Frenzel, C.; Majoros, W.H.; Chi, J.-T.A.; Braich, R.; Muthiah, M.; Soutschek, J.; Ohler, U.; Cullen, B.R. (2007). A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. *Nature Letters*, 450:1096-1099.
- Gouy, M.; Guindon, S.; Gascuel, O. (2010). SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*, 27:221-224.
- Govindarajan, R.; Koteeswaran, A.; Venugopalan, A.T.; Shyam, G.; Shagu, S.; Shaila M.S.; Ramachandran, S. (1997). Isolation of peste des petits ruminants virus (PPRV) from an outbreak in Indian Buffalo (*Bubalus bubalus*). *Veterinary Record*, 141:573–4.
- Grachev, M.A.; Kumarev, V.P.; Mamaev, L.V.; Zorin, V.L.; Baranova, L.V.; Denikina, N.N.; Belikov, S.I.; Petrov, E.A. (1989). Distemper virus in Baikal seals. *Nature*, 338:209.
- Grimm, D.; Streetz, K.L.; Jopling, C.L.; Storm, T.A.; Pandey, K.; Davis, C.R.; Marion, P.; Salazar, F.; Kay, M.A. (2006). Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*, 441:537-541.
- Guo, S.; Kempkes, K.J. (1995). Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser-Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, 81:611-20.

- Gupta, A.; Gartner, J.J.; Sethupathy, P.; Hatzigeorgiou, A.G.; Fraser, N.W. (2006). Anti-apoptotic function of a micorRNA encoded by the HSV-1 latency-associated transcript. *Nature Letters*, 44:82-85.
- Haasnoot, J.; de Vries, W.; Geutjes, E.-J.; Prins, M.; de Haan, P.; Berkhout, B. (2007). The ebola virus VP35 protein is a supressor of RNA silencing. *PLoSPathogens*, 3(6):794-803.
- Hacein-Bey-Abina, S.; von Kalle, C.; Schidt, M.; LeDeist, F.; Wulffraat, N.; McIntyre, E.; Radford, I.; Villeval, J.L.; Fraser, C.C.; Cavazzana-Calvo, M.; Fischer, A. (2003). A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *The New England Journal of Medicine*, 348:255-256.
- Haffar, A.; Libeau, G.; Moussa, A.; Minet, C.; Diallo, A. (1999). The matrix protein gene sequence analysis reveals close relationship between peste des petits ruminants virus (PPRV) and dolphin morbillivirus. *Virus Research*, 64:69-75.
- Halpin, K.; Benkamp, B.; Harcourt, B.H.; Bellini, W.J.; Rota, P.A. (2004). Nipah virus conforms to the rule of six in a minigenome replication assay. *Journal of General Virology*, 85:701-707.
- Hamdy, F.M.; Dardiri, A.H.; Andnduaka, O. (1976). Etiology of stomatitis-pneumoenteritis complex in Nigerian dwarf goats. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 40:276-284.
- Hamdy, F.M.; Dardiri, A.H. (1976). Response of white-tailed deer to infection with peste des petits ruminants virus. *Journal of Wildlife Diseases*, 12(4):516-22.
- Hamilton, A.; Voinnet, O.; Chappell, L.; Baulcombe, D. (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO Journal*, 21:4671-4679.
- Hammilton, A.; Baulcombe, D.C. (1999). A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *Science*, 286:950-952.
- Hammond, S.M.; Bernstein, E.; Beach, D.; Hannon, G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404:293-296.

Hanada, K.; Suzuki, Y.; Gojobori, T. (2004). A large variation in the rates of synonymous substitution for RNA viruses and its relationship to a diversity of viral infection and transmission modes. *Molecular Biology and Evolution*, 21(6):1074-1080.

Hannon, G.J. (2002). RNA interference. *Nature*, 418:244-251.

Harty, R.N.; Palese, P. (1995). Measles virus phosphoprotein (P) requires the NH<sub>2</sub>- and COOH-terminal domains for interactions with the nucleoprotein (N) but only the COOH terminus for interactions with itself. *Journal of General Virology*, 76:2863-2867.

Hemann, M.T.; Fridman, J.S.; Zilfou, J.T.; Hernando, E.; Paddison, P.J.; Cordon-Cardo, C.; Hannon, G.J.; Lowe, S.W. (2003). An epi-allelic series of p53 hypomorphs created by stable RNAi produces distinct tumor phenotypes in vivo. *Nature Genetics*, 33:396-400.

Hilleman, M.R.; Buynak, E.B.; Weibel, R. (1968). Development and evaluation of the Moraten measles virus vaccine. *The Journal of American Medical Association*, 206:587-590.

Hilleman, M.R.; Stokes, J.; Buynak, E.B.; Weibel, R.; Halenda, R.; Goldner, H. (1962). Ender's live measles-virus vaccine with human immune globulin. II. Evaluation of efficacy. *American Journal of Diseases of Children*, 103:372-379.

Hofmann, C.; Strauss, M. (1998). Baculovirus-mediated gene transfer in the presence of human serum or blood facilitated by inhibition of the complement system. *Gene Therapy*, 5(4):531-536.

Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*, 6:65-70.

Horikami, S.M.; Smallwood, S.; Moyer, S.A. (1996). The Sendai virus V protein interacts with the NP protein to regulate viral genome RNA replication. *Virology*, 222:383-390.

Hosmer, D.W.; Lemeshow, S. (1999). *Applied survival analysis: regression modeling of time to event data*. New York: John Wiley, 386 p.

Huelsenbeck, J.P.; Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17:754-755.

Hughes, V. (2007). Therapy on trial. *Nature Medicine*, 13:1008-1009.

Ichim, T.E.; Li, M.; Qian, H.; Popov, I.A.; Rycerz, K.; Zheng, X.; White, D.; Zhong, R.; Min, W.P. (2004). RNA interference: A potent tool for gene-specific therapeutics. *American Journal of Transplantation*, 4:1227-1236.

Jackson, A. L.; Burchard, J.; Schelter, J.; Chau, B.N.; Cleary, M.; Lim, L.; Linsley, P.S. (2006). Widespread siRNA “off-target” transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA*, 12:1179-1187.

Jenkins, G.M.; Rambaut, A.; Pybus, O.G.; Holmes, E.C. (2002). Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. *Journal of Molecular Evolution*, 54:156-165.

Jensen, M.R.; Communie, G.; Ribeiro, E.A.Jr.; Martinez, N.; Desfosses, A.; Salmon, L.; Mollica, L.; Gabel, F.; Jamin, M.; Longhi, S.; Ruigrok, R.W.; Blackledge, M. (2011). Intrinsic disorder in measles virus nucleocapsids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(24):9839-9844.

Ji, J.; Glaser, A.; Wernli, M.; Berke, J.M.; Moradpour, D.; Erb, P. (2008). Suppression of short interfering RNA-mediated gene silencing by the structural proteins of hepatitis C virus. *Journal of General Virology*, 89:2761-2766.

Judge, A.D.; Sood, V.; Shaw, J.R.; Fang, D.; McClintock, K.; MacLachlan, I. (2005). Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate response by synthetic siRNA. *Nature Biotechnology*, 23(4):457-462.

Kamath, R.S.; Fraser, A.G.; Dong, Y.; Poulin, G.; Durbin, R.; Gotta, M.; Kanapink, A.; Le Bot, N.; Moreno, S.; Sohrmann, M.; Welchman, D.P.; Zipperlen, P.; Ahringer, J. (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature*, 421:220-221.

Kanda, T.; Kusov, Y.; Yokosuka, O.; Gauss-Muller, V. (2004). Interference of hepatitis A virus replication by small interfering RNAs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 318:341-345.

Kaplan, E.L.; Meier, P. (1958). Non parametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association*, 53:457-481.

Karlin, D.; Longhi, S.; Receveur, V.; Canard, B. (2002). The N-terminal domain of the phosphoprotein of Morbilliviruses belongs to the natively unfolded class of proteins. *Virology*, 296:251-262.

Kasschau, K.D.; Carrington, J.C. (1998). A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 95:461-470.

Kato, A.; Kiyotani, K.; Sakai, Y.; Yoshida, T.; Nagai, Y. (1997). The paramyxovirus, Sendai virus, V protein encodes a luxury function required for viral pathogenesis. *Embo Journal*, 16:578- 87.

Katz, M. (1995). Clinical spectrum of measles. In: *Measles Virus*. Billeter, M.A.; ter Meulen, V. (editors), New York: Springer-Verlag, p. 1-12.

Keita, D.; Heath, L.; Albina, E. (2010). Control of African swine fever virus replication by small interfering RNA targeting the A151R and VP72 genes. *Antiviral Therapy*, 15:727-736.

Keita, D.; Servan de Almeida, R.; Libeau, G.; Albina, E. (2008). Identification and mapping of a region on the mRNA of Morbillivirus nucleoprotein susceptible to RNA interference. *Antiviral Research*, 80:158-167.

Kennerdell, J.R.; Carthew, R.W. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell*, 95:1017-1026.

Khvorova, A.; Reynolds, A.; Jayasena, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115:209-216.

Kim, D.H.; Behlke, M.A.; Rose, S.D.; Chang, M.S.; Choi, S.; Rossi, J.J. (2005). Synthetic dsRNA DICER substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nature Biotechnology*. 23(2):222-226.

Kingston, R.L.; Baase, W.A.; Leslie, S.G. (2004). Characterization of nucleocapsid binding by the measles virus and mumps virus phosphoproteins. *The Journal of Virology*, 78:8630-8640.

Kinne, J.; Kreutzer, M.; Wernery, U.; Wohlsein, P. (2010). Peste des petits ruminants in Arabian wildlife. *Epidemiology and Infection*, 138:1211-1214.

- Konishi, M.; Wu, C.H.; Kaito, M.; Hayashi, K.; Watanabe, S.; Adachi, Y.; Wu, G.Y. (2006). siRNA-resistance in treated HCV replicon cells is correlated with the development of specific HCV mutations. *Journal of Viral Hepatitis*, 13:756-761.
- Kost, T.A.; Condreay, J.P. (2002). Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. *Trends in Biotechnology*, 20(4):173-180.
- Kul, O.; Kabakci, N.; Atmaca, H.T.; Özkul, A. (2007). Natural peste des petits ruminants virus infection: novel pathologic findings resembling other morbillivirus infections. *Veterinary Pathology*, 44:479-486.
- Kumar, A.; Panda, S.K.; Durgapal, H.; Acharya, S.K.; Rehman, S.; Kar, U.K. (2010). Inhibition of hepatitis E virus replication using short hairpin RNA (shRNA). *Antiviral Research*, 85:541-550.
- Kusov, Y.; Kanda, T.; Palmenberg, A.; Sgro, J.Y.; Gauss-Müller, V. (2006). Silencing of hepatitis A virus infection by small interfering RNAs. *The Journal of Virology*, 80:5599-610.
- Kwiatek, O.; Ali, Y.H.; Saeed, I.K.; Khalafalla, A.I.; Mohamed, O.I.; Obeida, A.A.; Abdelrahman, M.B.; Osman, H.M.; Taha, K.M.; Abbas, Z.; El Harrak, M.; Lhor, Y.; Diallo, A.; Lancelot, R.; Albina, E.; Libeau, G. (2011). Asian Lineage of Peste des Petits Ruminants Virus, Africa. *Emerging Infectious Diseases*, 17(7):1223-1231.
- Kwiatek, O.; Minet, C.; Grillet, C.; Hurard, C.; Carlsson, E.; Karimov, B.; Albina, E.; Diallo, A.; Libeau, G. (2007). Peste des Petits Ruminants (PPR) Outbreak in Tajikistan. *Journal of Comparative Pathology*, 136:111-119.
- Laine, D.; Trescol-Biemont, M.C.; Longhi, S.; Libeau, G.; Marie, J.C.; Vidalain, P.O.; Azocar, O.; Diallo, A.; Canard, B.; Rouboudin-Combe, C.; Valentin, H. (2003). Measles virus (MV) nucleoprotein binds to a novel cell surface receptor distinct from FcγRII via its C-terminal domain: role in MV-induced immunosuppression. *The Journal of Virology*, 77:11332-11346.
- Lamb, R.A., Kolakofsky, D. (2001). Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: *Fields Virology*. Knipe, D.M.; Howley, P.M. (Eds.), Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, p. 1305–1340.
- Lee, Y.S.; Dutta, A. (2009). MicroRNAs in cancer. *Annual Review of Pathology*, 4:199-227.

Lefèvre, P.C.; Diallo, A. (1990). La peste des petits ruminants. *Revue Scientifique et Technique du Office International de Epizootie*, 9(4):935-981.

Lefèvre, P.C. (2003). Peste bovine. In : Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail. Europe et régions chaudes. Lefèvre, P.C.; Blancou, J.; Chermette, R., Paris: Tec & Doc. (editor), p. 285-305.

Levenkova, N.; Gu, Q.; Rux, J.J. (2004). Gene specific siRNA selector. *Bioinformatics*, 20:430-432.

Libeau, G.; Diallo, A.; Calvez, D.; Lefèvre, P. C. (1992). A competitive ELISA using anti-N monoclonal antibodies for specific detection of rinderpest in cattle and small ruminants. *Veterinary Microbiology*, 31:147-160.

Libeau, G.; Diallo, A.; Colas, F.; Guerre, L. (1994). Rapid differential diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants using an immunocapture ELISA. *Veterinary Record*, 134:300–304.

Libeau, G.; Prehaud, C.; Lancelot, R.; Colas, F.; Guerre, L.; Bishop, D.H.; Diallo, A. (1995). Development of a competitive ELISA for detecting antibodies to the peste des petits ruminants virus using a recombinant nucleoprotein. *Research in Veterinary Science*, 58:50-55.

Liess, B.; Plowright, W. (1964). Studies on the pathogenesis of rinderpest in experimental cattle. I : Correlation of clinical signs, viraemia and virus excretion by various routes. *Journal of Hygiene*, 62:81-100.

Likhoshway, Y.V.; Grachev, M.A.; Kumarev, V.P.; Solodun, Y.V.; Goldberg, O.A.; Belykh, O.I.; Nagieva, F.G.; Nikulina, V.G.; Kolesnik, B.S. (1989). *Nature*, 339:266.

Lipardi, C.; Wei, Q.; Paterson, B.M. (2001). RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell*, 107:297-307.

Liston, P.; Batal, R.; DiFlumeri, C.; Briedis, D.J. (1997). Protein interaction domains of the measles virus nucleocapsid protein (NP). *Archives of Virology*, 142:305-321.

Liston, P.; Briedis, D.J. (1995). Ribosomal frameshifting during translation of measles virus P protein mRNA is capable of directing synthesis of a unique protein. *Journal of Virology*, 69:6742-6750.

Li, W.X.; Li, H.; Lu, R.; Li, F.; Dus, M.; Atkinson, P.; Brydon, E.W.; Johnson, K.L.; Garcia-Sastre, A.; Ball, L.A.; Palese, P.; Ding, S.W. (2004). Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:1350-1355.

Longhi, S.; Oglesbee, M. (2010). Structural disorder within the measles virus nucleoprotein and phosphoprotein. *Protein and peptides letters*, 17(8):961-978.

Longhi, S.; Receveur-Brechot, V.; Karlin, D.; Johansson, K.; Darbon, H.; Bhella, D.; Yeo, R.; Finet, S.; Canard, B. (2003). The C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein is intrinsically disordered and folds upon binding to the C-terminal moiety of the phosphoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*, 278:18638-18648.

Ludlow, M.; Allen, I.; Schneider-Schaulies, J. (2009). Systemic spread of measles virus: overcoming the epithelial and endothelial barriers. *Thrombosis and Haemostasis*, 102(6):1050-6.

Luo, K.Q.; Chang, D.C. (2004). The gene-silencing efficiency of siRNA is strongly dependent on the local structure of mRNA at the target region. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 318:303-310.

Maillard, J.C.; Van, K.P.; Nguyen, T.; Van, T.N.; Berthouly, C.; Libeau, G.; Kwiatek, O. (2008). Examples of probable host-pathogen co-adaptation/co-evolution in isolated farmed animal populations in the mountainous regions of North Vietnam. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149:259-262.

Manchester, M.; Nanche, D.; Stehle, T. (2000). CD46 as a measles receptor: form follows function. *Virology*, 274:5-10.

Manjunath, N.; Kumar, P.; Lee, S.K.; Shankar, P. (2006). Interfering antiviral immunity: application, subversion, hope? *Trends in Immunology*, 27:328-335.

Manly, B.F.J. (2006). Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology. Laramie: Chapman & Hall/CRC Press, 480 p.

Ma, Z.; Li, J.; He, F.; Wilson, A.; Pitt, B.; Li, S. (2005). Cationic lipids enhance siRNA-mediated interferon response in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330:755-759.



McCaffrey, A.P.; Meuse, L.; Pham, T.T.; Conklin, D.S.; Hannon, G.J.; Kay, M.A. (2002). RNA interference in adult mice. *Nature*, 418:38-39.

McCaffrey, A.P.; Nakai, H.; Pandey, K.; Huang, Z.; Salazar, F.H.; Xu, H.; Wieland, S.F.; Marion, P.L.; Kay, M.A. (2003). Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nature Biotechnology*, 21(6):639-644.

McDonagh, P.; Sheehy, P.A.; Norris, J.M. (2011). In vitro inhibition of feline coronavirus replication by small interfering RNAs. *Veterinary Microbiology*, 150:220-229.

Meyer, G.; Diallo, A. (1995). The nucleotide sequence of the fusion protein gene of the peste des petits ruminants virus: the long untranslated region in the 5'-end of the F-protein gene of morbilliviruses seems to be specific to each virus. *Virology Research*, 37(1):23-25.

Minet, C.; Kwiatek, O.; Keita, D.; Diallo, A.; Libeau, G.; Albina, E. (2009). Infections à Morbilivirus chez les ruminants : la peste bovine en voie d'éradication et la peste des petits ruminants en extension vers le Nord. *Virologie*, 13(2):103-113.

Morgan, E.M.; Rapp, F. (1977). Measles virus and its associated diseases. *Bacteriological Reviews*, 41(3):636-666.

Moyer, S.A.; Baker, S.C.; Horikami, S.M. (1990). Host cell proteins required for measles virus reproduction. *Journal of General Virology*, 71:775-783.

Murphy, F.A.; Gibbs, E.P.J.; Horzinek, M.C.; Studdert, M.J. (1999). *Veterinary virology*. San Diego, California: Academic Press, p. 411- 428.

Nanan, R.; Rauch, A.; Kampgen, E.; Niewiesk, S.; Kreth, H.W. (2000). A novel sensitive approach for frequency analysis of measles virus-specific memory T-lymphocytes in healthy adults with a childhood history of natural measles. *Journal of General Virology*, 81:1313-1319.

Napoli, C.; Lemieux, C.; Jorgensen, R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible cosuppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell*, 2:279-289.

- Nawathe, D.R.; Taylor, W.P. (1979). Experimental infection of domestic pigs with the virus of peste des petits ruminants. *Tropical Animal Health and Production*, 11(2):120-122.
- Nelson, J.A. (2007). Small RNAs and large DNA viruses. *New England Journal of Medicine*, 357:2630-2632.
- Nichol, S.T.; Arikawa, J.; Kawaoka, Y. (2000). Emerging viral diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97:12411-12412.
- Nishikura, K. (2001). A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst. *Cell*, 107:415-418.
- Nishio, M.; Tsurudome, M.; Kawano, M.; Watanabe, N.; Ohgimoto, S.; Ito, M.; Komada, H.; Ito, Y. (1996). Interaction between nucleocapsid protein (NP) and phosphoprotein (P) of human parainfluenza virus type 2: one of the two NP binding site on P is essential for granule formation. *Journal of General Virology*, 77:2457-2463.
- Nishitsuji, H.; Kohara, M.; Kannagi, M.; Masuda, T. (2006). Effective suppression of human immunodeficiency virus type 1 through a combination of short- or long-hairpin RNAs targeting essential sequences for retroviral integration. *The Journal of Virology*, 80(15):7658-7666.
- Nizamani, Z.A. (2010). Délivrance *in vivo* de siRNA et évaluation de leur effet antiviral contre le virus de la peste des petits ruminants (PPRV). Thèse doctorat: discipline virologie, Université Montpellier II, Montpellier, 136 p.
- Norrby, E.; Sheshberadaran, H.; McColloch, K.C. (1985). Is rinderpest the archetype of the morbillivirus genus? *Intervirology*, 23:228-232.
- Novina, C.D.; Sharp, P.A. (2004). The RNAi revolution. *Nature*, 430:161-164.
- Obi, T.U. (1984). The detection of peste des petits ruminants (PPR) virus antigen by agar gel precipitation test and counter-immunoelectrophoresis. *The Journal of Hygiene*, 93:579-586.
- Oelgeschlager, M.; Larrain, J.; Geissert, D.; De Robertis, E.M. (2000). The evolutionarily conserved bmp-binding protein twisted gastrulation promotes bmp signalling. *Nature*, 405:757-763.

- Ogunsanmi, A.O.; Awe, E.O.; Oni, T.U.; Taiwo, V.O. (2003). Peste des petits ruminants (PPR) virus antibodies in african grey duiker (*Sylvicapra grimmia*). *African Journal of Biomedical Research*, 6(1):59-61.
- Ong, S.T.; Li, F.; Du, J.; Tan, Y.W.; Wang, S. (2005). Hybrid cytomegalovirus enhancer-H1 promoter-based plasmid and baculovirus vectors mediate effective RNA interference. *Humman Gene Therapy*, 16:1404-1412.
- Osterhaus, A.D.M.E.; Vedder, E.J. (1988). Identification of virus causing recent seal deaths. *Nature*, 335:20.
- Otaki, M.; Sada, K.; Kadoya, H.; Nagano-Fujii, M.; Hotta, H. (2006). Inhibition of measles virus and subacute sclerosing panencephalitis virus by RNA interference. *Antiviral Research*, 70:105-111.
- Otte, E. (1960). Clinical studies on « abu nini » in the Sudan: a contagious disease of goats and sheep possibly caused by pleuropneumonia-like organism. *Veterinary Record*, 72:140-145.
- Ozkul, A.; Akca, Y.; Alkan, F.; Barrett, T.; Karaoglu, T.; Daglap, S.B.; Anderson, J.; Yesilbag, K.; Cokcaliskan, C.; Genacy, A.; Burgu, I. (2002). Prevalence, distribution and host range of peste des petits ruminants virus, Turkey. *Emerging Infectious Diseases*, 8:708-12.
- Pak, J.; Fire, A. (2007). Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*. *Science*, 315:241-244.
- Palmer, D.J.; Ng, P. (2005). Helper-dependent adenoviral vectors for gene therapy. *Human Gene Therapy*, 16(1):1-16.
- Parent du Châtelet, I.; Antona, D.; Freymuth, F.; Muscat, M.; Halftermeyer-Zhou, F.; Maine, C.; Floret, D.; Levy-Bruhl. (2010). Spotlight on measles 2010:update on the ongoing measles outbreak in France, 2008-2010. *Eurosurveillance*, 15(36).
- Parks, C.L.; Witko, S.E.; Kotash, C.; Lin, S.L.; Sidhu, M.S.; Udem, S.A. (2006). Role of V protein RNA binding in inhibition of measles virus minigenome replication. *Virology*, 348:96-106.

Pastoret, P.P.; Van Bresseem, M.F.; Diallo, A.; Barrett, T.; Tillé, A.; Thiry, E.; Lefèvre, P.C.; Bostock, C.; Idriss, A.F.; Bidjeh, K. (1991). La biologie des infections par Morbillivirus. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 135:77-89.

Patterson, J.B.; Thomas, D.; Lewicki, H.; Billeter, M.A.; Oldstone, M.B. (2000). V and C proteins of measles virus function as virulence factors *in vivo*. *Virology*, 267:80-9.

Patzel, V.; Rutz, S.; Dietrich, I.; Köberle, C.; Scheffold, A.; Kaufmann, S.H.E. (2005). Design of siRNA producing unstructured guide-RNAs results in improved RNA interference efficiency. *Nature Biotechnology*, 23:1440-1444.

Peebles, M.E. (1991). Paramyxovirus M proteins: pulling it all together and taking it on the road. In: *The Paramyxoviruses*. Kingsbury, D.W. (ed.), New York: Plenum Press, p. 427-456.

Perry, B.D.; Randolph, T.F.; McDermott, J.J.; Sones, K.R.; Thornton, P.K. (2002). Investing in animal health research to alleviate poverty. Nairobi, Kenya: ILRI (International Livestock Research Institute), 148 p.

Pfeffer, S.; Sewer, A.; Lagos-Quintana, M.; Sheridan, R.; Sander, C.; Grässer, F.A.; van Dyk, L.F.; Ho, C.K.; Shuman, S.; Chien, M.; Russo, J.J.; Ju, J.; Randall, G.; Lindenbach, B.D.; Rice, C.M.; Simon, V.; Ho, D.D.; Zavolan, M.; Tuschl, T. (2005). Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nature Methods*, 2:269-276.

Pfeffer, S.; Zavolan, M.; Grässer, F.A.; Chien, M.; Russo, J.J.; Ju, J.; John, B.; Enright, A.J.; Marks, D.; Sander, C.; Tuschl, T. (2004). Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*, 304:734-736.

Plempner, R.K.; Hammond, A.L.; Gerlier, D.; Fielding, A.K.; Cattaneo, R. (2002). Strength of envelope protein interaction modulates cytopathicity of measles virus. *The Journal of Virology*, 76:5051-5061.

Plempner, R.; Snyder, J.P. (2009). Measles control – can measles virus inhibitors make a difference? *Current Opinion in Investigational Drugs*, 10(8):811-820.

Plowright, W. (1952). Observations on the behaviour of rinderpest virus in indigenous African sheep. *British Veterinary Journal*, 108:450–457.

Plowright, W.; Taylor, W.P. (1967). Long-term studies of the immunity in East African Cattle following inoculation with rinderpest culture vaccine. *Research in Veterinary Science*, 8:119-128.

Plowright, W. (1984). The duration of immunity in cattle following inoculation of rinderpest cell culture vaccine. *The Journal of Hygiene*, 92:285-296.

Pusch, O.; Boden, D.; Silbermann, R.; Lee, F.; Tucker, L.; Ramratnam, B. (2003). Nucleotide sequence homology requirements of HIV-1-specific short hairpin RNA. *Nucleic Acids Research*, 31(22):6444-6449.

Qu, F.; Morris, T.J. (2005). Suppressors of RNA silencing encoded by plant viruses and their role in viral infections. *FEBS Letters*, 579:5958-5964.

Radecke, F.; Billeter, M.A. (1996). The nonstructural C protein is not essential for multiplication of Edmonston B strain measles virus in cultured cells. *Virology*, 217:418-421.

Radhakrishnan, S.; Layden, T.J.; Gartel, A.L. (2004). RNA interference as a new strategy against viral hepatitis. *Virology*, 323:173-181.

Rajak, K.K.; Sreenivasa, B.P.; Hosamani, M.; Singh, R.P.; Singh, S.K.; Singh, R.K.; Bandyopadhyay, S.K. (2005). Experimental studies on immunosuppressive effects of peste des petits ruminants (PPR) virus in goats. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 28:287-96.

Rao, N.M. (2010). Cationic lipid-mediated nucleic acid delivery: beyond being cationic. *Chemistry and Physics of Lipids*, 163(3):245-252.

Ravanel, K.; Castelle, C.; Defrance, T.; Wild, T.F.; Charron, D.; Lotteau, V.; Rabourdin-Combe, C. (1997). Measles virus nucleocapsid protein binds to FcγRII and inhibits human B cell antibody production. *The journal of experimental medicine*, 186(2):269-278.

Reed, L.J.; Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene*, 27:493-497.

Reich, S.J.; Fosnot, J.; Kuroki, A.; Tang, W.; Yang, X.; Maguire, A.M.; Bennett, J.; Tolentino, M.J. (2003). Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Molecular Vision*, 9:210-216.

Reutter, G.L.; Cortese-Grogan, C.; Wilson, J.; Moyer, S.A. (2001). Mutations in the measles virus C protein that up regulate viral RNA synthesis. *Virology*, 285: 100-9.

Reuter, T.; Weissbrich, B.; Schneider-Schaulies, S.; Schneider-Schaulies, J. (2006). RNA interference with measles virus N, P, and L mRNAs efficiently prevents and with matrix protein mRNA enhances viral transcription. *The Journal of Virology*, 80(12):5951-5957.

Reynolds, A.; Leake, D.; Boese, Q.; Scaringe, S.; Marshall, W.S.; Khvorova, A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotechnology*, 22(3):326-330.

Robbins, M.A.; Rossi, J.J. (2005). Sensing the danger in RNA. *Nature Medecine*, 11:250-251.

Rodostits, O.M.; Gay, C.C.; Hinchcliff, K.W.; Constable, P.D. (2007). *Veterinary Medicine, a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. London: W. B. Saunders Co. Ltd. (editors), 2065 p.

Roeder, P.L.; Obi, T.U.; Taylor, W.; Diallo, A. (2000). Reconnaître la peste des petits ruminants. Manuel de terrain (french). In : Manuel FAO de Santé Animale, n. 5, FAO. Rome (Italie): Div. Prod. et Santé Anim., 28 p.

Roger, F.; Gebre, Y.M.; Libeau, G.; Diallo, A.; Yigezu, L.M.; Yilma, T. (2001). Detection of antibodies of rinderpest and peste des petits ruminants viruses (Paramyxoviridae, Morbillivirus) during a new epizootic disease in Ethiopian camels (*Camelus dromadarius*). *Revue de Médecine Vétérinaire*, 152:265–8.

Rossiter, P.B. (2004). Rinderpest. In: *Infectious diseases of Livestock*. Coetzer, J.A.W.; Tustin, R.C. (eds), Southern Africa: Oxford Southern Africa, p. 629-659.

Rossiter, P.B. (1994). Rinderpest. In: *Infectious diseases of livestock with special reference to South Africa*. Coetzer, J.A.W.; Thompson, G.R.; Tustin, R.C.; Kriek, N.P. (eds.), Cape Town: Oxford University Press, p. 735-757.

Rossiter, P.B.; Taylor, W.P. (1994). Peste des petits ruminants. In: *Infectious diseases of livestock*. Coetzer, A.W.; Thomson, G.R.; Tustin, R.C. (eds), Southern Africa: Oxford Southern Africa, p. 758–765.

Rossiter, P.B.; Wardley, R.C. (1985). The differential growth of virulent and avirulent strains of rinderpest virus in bovine lymphocytes and macrophages. *Journal of General Virology*, 66:969–75.

Roux, L. (2005). Dans le génome des Paramyxovirinae, les promoteurs et leurs activités sont façonnés par la « règle de six ». *Virologie*, 9:19-34.

Rowland, A.C., Bourdin, P. (1970). The histological relationship between peste des petits ruminants and kata in West Africa. *Revue d Elevage et de Medecine Veterinaire des Pays Tropicaux*, 23:301–7.

Rowland, A.C.; Scott, G.R.; Hill, D.H. (1969). The pathology of an erosive stomatitis and enteritis in West African dwarf goats. *Journal of Pathology*, 98:83–7.

Runkler, N.; Pohl, C.; Schneider-Schaulies, S.; Klenk, H.D.; Maisner, A. (2007). Measles virus nucleocapsid transport to the plasma membrane requires stable expression and surface accumulation of the viral matrix protein. *Cell Microbiology*, 9(5):1203-1214.

Sabariego, R.; Giménez-Barcons, M.; Tàpia, N.; Clotet, B.; Martinez, M.A. (2006). Sequence homology required by human immunodeficiency virus type 1 to escape from short interfering RNAs. *The Journal of Virology*, 80(2):571-577.

Sabella, C. (2010). Measles: not just a childhood rash. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 77(3):207-213.

Saksela, K. (2003). Human viruses under attack by small inhibitory RNA. *Trends of Microbiology*, 11:345–347.

Sarkar, J.; Sreenivasa, B.P.; Singh, R.P.; Dhar, P.; Bandyopadhyay, S.K. (2003). Comparative efficacy of various chemical stabilizers on the thermostability of a live-attenuated peste des petits ruminants (PPR). *Vaccine*, 21:4728–35.

Sarnow, P.; Jopling, C.L.; Norman, K.L.; Schütz, S.; Wehner, K.A. (2006). MicroRNAs: expression, avoidance and subversion by vertebrate viruses. *Nature Reviews Microbiology*, 4:651-659.

Sato, H.; Masuda, M.; Kanai, M.; Tsukiyama-Kohara, K.; Yoneda, M.; Kai, C. (2007). Measles virus N protein inhibits host translation by binding to EIF3-P40. *Journal of Virology*, 81(21):11569-11576.

Saulnier, A.; Pelletier, I.; Labadie, K.; Colbère-Garapin, F. (2005). Complete cure of persistent virus infections by antiviral siRNAs. *Molecular Therapy*, 13(1):142-150.

Saxena, S.; Jonsson, Z.O.; Dutta, A. (2003). Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 278:44312-44319.

Schneider, H.; Kaelin, K.; Billeter, M.A. (1997). Recombinant measles viruses defective for RNA editing and V protein synthesis are viable in cultured cells. *Virology*, 227:314-322.

Schneider-Schaulies, S.; Niewiesk, S.; Schneider-Schaulies, J.; Volker ter Meulen, V. (2001). Measles virus induced immunosuppression: targets and effector mechanisms. *Current Molecular Medicine*, 1:163–81.

Schnell, M.J.; Conzelmann, K.K. (1995). Polymerase activity of in vitro mutated rabies virus L protein. *Virology*, 214:522-530.

Schopman, N.C.T.; ter Brake, O.; Berkhout, B. (2010). Anticipating and blocking HIV-1 escape by second generation antiviral shRNAs. *Retrovirology*, 7:52.

Servan de Almeida, R.; Keita, D.; Libeau, G.; Albina, E. (2007). Control of ruminant morbillivirus by small interfering RNA. *Journal of General Virology*, 88(8):2307-2311.

Servan de Almeida, R.; Keita, D.; Libeau, G.; Albina, E. (2008). Structure and sequence motifs of siRNA linked with in vitro down-regulation of morbillivirus gene expression. *Antiviral Research*, 79:37-48.

Servet-Delprat, C.; Vidalain, P.O.; Valentin, H.; Rabourdin-Combe, C. (2003). Measles virus and dendritic cell functions: how specific response cohabits with immunosuppression. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 276:103–23.

Seth, S.; Templin, M.V.; Severson, G.; Baturevych, O. (2010). A potential therapeutic for pandemic influenza using RNA interference. *Methods in Molecular Biology*, 623:397-422.

Shaffer, J.A.; Bellini, W.J.; Rota, P.A. (2003). The C protein of measles virus inhibits the type I interferon response. *Virology*, 315:389-97.



- Shaji, D.; Shaila, M.S. (1999). Domains of rinderpest virus phosphoprotein involved in interaction with itself and the nucleocapsid protein. *Virology*, 258:415-424.
- Sharp, P.A. (1999). RNAi and double-strand RNA. *Genes and Development*, 13:139-141.
- Sheldon, J.; Soriano, V. (2008). Hepatitis B virus escape mutants induced by antiviral therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61:766-768.
- Shin, D.; Lee, H.; Kim, S.I.; Yoon, Y.; Kim, M. (2009). Optimization of linear double-stranded RNA for the production of multiple siRNAs targeting hepatitis C virus. *RNA*, 15:989-910.
- Sijen, T.; Fleenor, J.; Simmer, F.; Thijssen, K.L.; Parrish, S.; Timmons, L.; Plasterk, R.A.; Fire, A. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*, 107:465-476.
- Singer, O.; Marr, R.A.; Rockenstein, E.; Crews, L.; Coufal, N.G.; Gage, F.H.; Verma, I.M.; Masliah, E. (2005). Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nature Neuroscience*, 8:1343-1349.
- Skalsky, R.L.; Samols, M.A.; Plaisance, K.B.; Boss, I.W.; Riva, A.; Lopez, M.C.; Baker, H.V.; Renne, R. (2007). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes an ortholog of miR-155. *The Journal of Virology*, 81(23):12836-12845.
- Skiadopoulos, M.H.; Surman, S.; Tatem, J.M.; Paschalis, M.; Wu, S.L.; Udem, S.A.; Durbin, A.P.; Collins, P.L.; Murphy, B.R. (1999). Identification of mutations contributing to the temperature- sensitive, cold-adapted, and attenuation phenotypes of the live-attenuated cold- passage 45 (cp45) human parainfluenza virus 3 candidates vaccine. *Journal of Virology*, 73:1374-81.
- Soldan, S.S.; Plassmeyer, M.L.; Matukonis, M.K.; Gonzales-Scarano, F. (2005). La Crosse virus nonstructural protein NSs counteracts the effects of short interfering RNA. *The Journal of Virology*, 79:234-244.
- Stadlmann, S.; Lenggenhager, D.M.; Alves, V.A.; Nonogaki, S.; Kocher, T.M.; Schmid, H.-R.; Singer, G. (2011). Histopathologic characteristics of the transitional stage of measles-associated appendicitis: case report and review of the literature. *Human Pathology*, 42:285-290.

Stein, P.; Svoboda, P.; Anger, M.; Schultz, R.M. (2003). RNAi: mammalian oocytes do it without RNA-dependent RNA polymerase. *RNA*, 9:187-192.

Stern-Ginossar, N.; Saleh, N.; Goldberg, M.D.; Prichard, M.; Wolf, D.G.; Mandelboim, O. (2009). Analysis of human cytomegalovirus-encoded microRNA activity during infection. *The Journal of Virology*, 83(20):10684-10693.

Sudfeld, C.R.; Navar, A.M.; Halsey, N.A. (2010). Effectiveness of measles vaccination and vitamin A treatment. *International Journal of Epidemiology*, 39:48-55.

Sui, G.; Soohoo, C.; Affar, E.B.; Gay, F.; Shi, Y.; Forrester, W.C.; Shi, Y. (2002). A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(8):5515-5520.

Sullivan, C.S.; Grundhoff, A.T.; Tevethia, S.; Pipas, J.M.; Ganem, D. (2005). SV-40-encoded microRNAs regulated viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature Letters*, 435:682-686.

Sullivan, C.S. (2008). New roles for large and small viral RNAs in evading host defences. *Nature Reviews Genetics*, 9:503-507.

Surowiak, P. (2003). Evaluation of transfection effectiveness using fluorescein-labelled oligonucleotides and various liposomes. *Folia Morphologica*, 62:397-399.

Svoboda, P.; Stein, P.; Hayashi, H.; Schultz, R.M. (2000). Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development*, 127:4147-4156.

Sweetman, D.A.; Miskin, J.; Baron, M.D. (2001). Rinderpest virus C and V proteins interact with the major (L) component of the viral polymerase. *Virology*, 281:193-204.

Takeshita, F.; Hokaiwado, N.; Honma, K.; Banas, A.; Ochiya, T. (2009). Local and systemic delivery of siRNAs for oligonucleotide therapy. *Methods in Molecular Biology*, 487:83-92.

Takeuchi, K.; Takeda, M.; Miyajima, N.; Ami, Y.; Nagata, N.; Suzuki, Y.; Shahnewaz, J.; Kadota, S.; Nagata, K. (2005). Stringent requirement for the C protein of wild-type measles virus for growth both in vitro and in macaques. *Journal of Virology*, 79:7838-44.

Tatsuo, H.; Yanagi, Y. (2002). The morbillivirus receptor SLAM (CD150). *Microbiology and Immunology*, 46:135-142.

Taylor, W.P.; al Busaidy, S.; Barrett, T. (1990). The epidemiology of peste des petits ruminants in the Sultanate of Oman. *Veterinary Microbiology*, 22:341–52.

Taylor, W.P.; Barrett, T. (2007). Rinderpest and peste des petits ruminants. In : *Disease of sheep*. Aitken: I.D. (ed.), 61:460-469.

Taylor, W.P. (1979). Protection of goats against peste des petits ruminants with attenuated rinderpest virus. *Research in Veterinary Science*, 27:321–324.

Taylor, W.P. (1984). The distribution and epidemiology of PPR. *Preventive Veterinary Medicine*, 2:157-166.

tenOever, B.R.; Servant, M.J.; Grandvaux, N.; Lin, R.; Hiscott, J. (2002). Recognition of the measles virus nucleocapsid as a mechanism of IRF-3 activation. *The Journal of Virology*, 76:3659-3669.

ter Brake, O.; Konstantinova, P.; Ceylan, M.; Berkhout, B. (2006). Silencing of HIV-1 with RNA interference: a multiple shRNA approach. *Molecular Therapy*, 14(6):883-92.

Thomas, C.E.; Ahrhardt, A.; Kay, M.A. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics*, 4:346-358.

Tober, C.; Seufert, M.; Schneider, H.; Billeter, M.A.; Johnston, I.C.; Niewiesk, S.; ter Meulen, V.; Schneider-Schaulies, S. (1998). Expression of measles virus V protein is associated with pathogenicity and control of viral RNA synthesis. *Journal of Virology*, 72:8124-32.

Tompkins, S.M.; Lo, C.Y.; Tumpey, T.M.; Epstein, S.L. (2004). Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(23):8682-8686.

Trehan, S.; Sharma, G.; Misra, A. (2010). siRNA: sojourn from discovery to delivery challenges and clinics. *Systemic Reviews in Pharmacy*, 1(1):1-16.

Trono, D. (2000). Lentiviral vectors: turning a deadly foe into a therapeutic agent. *Gene Therapy*, 7(1):20-23.

Tuschl, T.; Borkhardt, A. (2002). Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy. *Molecular Interventions*, 2(3):158-167.

Unwalla, H.J.; Li, H.-T.; Bahner, I.; Li, M.-J.; Kohn, D.; Rossi, J.J. (2006). Novel pol II fusion promoter directs human immunodeficiency virus type 1-inducible coexpression of a short hairpin RNA and protein. *The Journal of Virology*, 80(4):1863-1873.

Uprichard, S.L.; Boyd, B.; Althage, A.; Chisari, F.V. (2005). Clearance of hepatitis B virus from the liver of transgenic mice by short hairpin RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(3):773-778.

Vaistij, F.E.; Jones, L.; Baulcombe, D.C. (2002). Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and putative RNA dependent RNA polymerase. *The Plant Cell*, 14:857-867.

Valsamakis, A.; Schneider, H.; Auwaerter, P.G.; Kaneshima, H.; Billeter, M.A.; Griffin, D.E. (1998). Recombinant measles viruses with mutations in the C, V, or F gene have altered growth phenotypes in vivo. *Journal of Virology*, 72:7754-7761.

van Oirschot, J.T. (1999). DIVA vaccines that reduce virus transmission. *Biotechnology*, 73:195-205.

Voinnet, O.; Vain, P.; Angell, S.; Baulcombe, D.C. (1998). Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell*, 95:177-187.

Von Eije, K.J.; ter Brake, O.; Berkhout, B. (2008). HIV-1 escape is restricted when conserved genome sequences are targeted by RNA interference. *The Journal of Virology*, 82(6):2895-2903.

Wang, Y.; Kato, N.; Jazag, A.; Dharel, N.; Otsuka, M.; Taniguchi, H.; Kawabe, T.; Omata, M. (2006). Hepatitis C virus core protein is a potent inhibitor of RNA silencing-based antiviral response. *Gastroenterology*, 130(3):883-892.

Westerhout, E.M.; Ooms, M.; Vink, M.; Das, A.T.; Berkhout, B. (2005). HIV-1 can escape from RNA interference by evolving an alternative structure in its RNA genome. *Nucleic Acid Research*, 33(2):796-804.

Wianny, F.; Zernicka-Goetz, M. (2000). Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nature Cell Biology*, 2:70-75.

- Wiebusch, L.; Truss, M.; Hegemeier, C. (2004). Inhibition of human cytomegalovirus replication by small interfering RNAs. *Journal of General Virology*, 85:179-184.
- Wilcoxon, F. (1945). Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics*, 1: 80-83.
- Wild, T.F.; Malvoisin, E.; Buckland, R. (1991). Measles virus: Both the haemagglutinin and fusion glycoprotein are required for fusion. *Journal of General Virology*, 72:439-442.
- Wilson, J.A.; Richardson, C.D. (2005). Hepatitis C virus replicons escape RNA interference induced by a short interfering RNA directed against the NS5b coding region. *The Journal of Virology*, 79:7050-7058.
- Witko, S.E.; Kotash, C.; Sidhu, M.S.; Udem, S.A.; Parks, C.L. (2006). Inhibition of measles virus minireplicon-encoded reporter gene expression by V protein. *Virology*, 348:107-19.
- Worrrwall, E.E.; Litamoi, J.K.; Seck, B.M.; Ayelet, G. (2001). Xerovac: An ultra rapid method for the dehydration and preservation of live attenuated rinderpest and peste des petits ruminants vaccines. *Vaccine*, 19:834–9.
- Wu, H.L.; Huang, L.R.; Huang, C.C.; Lai, H.L.; Liu, C.J.; Huang, Y.T.; Hsu, Y.W.; Lu, C.Y.; Chen, D.S.; Chen, P.J. (2005). RNA interference-mediated control of hepatitis B virus and emergence of resistant mutant. *Gastroenterology*, 128:708-716.
- Xia, H.; Mao, Q.; Paulson, H.L.; Davidson, B.L. (2002). siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nature Biotechnology*, 20:1006-1010.
- Xie, F.Y.; Woodle, M.C.; Lu, P.Y. (2006). Harnessing in vivo siRNA delivery for drug discovery and therapeutic development. *Drug Discovery Today*, 11:67-73.
- Yang, Z. (2007). PAML 4: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular Biology and Evolution*, 24:1586-1591 (<http://abacus.gene.ucl.ac.uk/software/paml.html>).
- Yiu, S.M.; Wong, P.W.H.; Lam, T.W.; Mui, Y.C.; Kung, H.F.; Lin, M.; Cheung, Y.T. (2005). Filtering of ineffective siRNAs and improved siRNA design tool. *Bioinformatics*, 21:144-151.

Yokota, S.; Saito, H.; Kubota, T.; Yokosawa, N.; Amano, K.; Fujii, N. (2003). Measles virus suppresses interferon-alpha signaling pathway: suppression of Jak1 phosphorylation and association of viral accessory proteins, C and V, with interferon-alpha receptor complex. *Virology*, 306: 135-46.

Zamore, P.D.; Tuschl, T.; Sharp, P.A.; Bartel, D.P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101:25-33.

Zeng, Y.; Cullen, B.R. (2003). Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA*, 9:112-123.

Zhang, X.; Bourhis, J.M.; Longhi, S.; Carsillo, T.; Buccellato, M.; Morin, B.; Canard, B.; Oglesbee, M. (2005). Hsp72 recognizes a P binding motif in the measles virus N protein C-Terminus. *Virology*, 337:162-74.

Zhang, X.; Glendening, C.; Linke, H.; Parks, C.L.; Brooks, C.; Udem, S.A.; Oglesbee, M. (2002). Identification and characterization of a regulatory domain on the carboxyl terminus of the measles virus nucleocapsid protein. *The Journal of Virology*, 76:8737-8746.

Zhang, X.; Godbey, W.T. (2006). Viral vectors for gene delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(4):515-534.

Zhiqiang, W.; Yaowu, Y.; Fan, Y.; Jian, Y.; Yongfeng, H.; Lina, Z.; Jianwei, W.; Qi, J. (2010). Effective siRNAs inhibit the replication of novel influenza A (H1N1) virus. *Antiviral Research*, 85(3):559-561.

## PUBLICATIONS EN RAPPORT AVEC LA THESE

1. Carine L. Holz, Emmanuel Albina, Cécile Minet, Renaud Lancelot, Olivier Kwiatak, Geneviève Libeau, Renata Servan de Almeida. RNA interference against animal viruses: how morbilliviruses generate extended diversity to escape siRNA control. The Journal of Virology, accepté.
2. Zaheer Ahmed Nizamani, Gunther M. Keil, Emmanuel Albina, Carine Holz, Cécile Minet, Olivier Kwiatak, Geneviève Libeau, Renata Servan de Almeida. (2011). Potential of adenovirus and baculovirus vectors for the delivery of shRNA against morbilliviruses. Antiviral Research 90:98–101.



## RNA Interference Against Animal Viruses: How Morbilliviruses Generate Extended Diversity to Escape siRNA Control



Carine L. Holz<sup>1</sup>, Emmanuel Albina<sup>1</sup>, Cécile Minet<sup>1</sup>, Renaud Lancelot<sup>1</sup>, Olivier Kwiatek<sup>1</sup>, Geneviève Libeau<sup>1</sup> and Renata Servan de Almeida<sup>1,\*</sup>

Author Affiliations

### ABSTRACT

Viruses are serious threats to human and animal health. Vaccines can prevent viral diseases, but only few antiviral treatments are available to control evolving infections. Among new antiviral therapies, RNA interference (RNAi) has been the focus of intensive research. However, along with the development of efficient RNAi-based therapeutics comes the risk of emergence of resistant viruses. In this study, we challenged the *in vitro* propensity of a morbillivirus (peste des petits ruminants virus), a stable RNA virus, to escape the inhibition conferred by single or multiple siRNAs against conserved regions of the N gene. Except with the combination of three different siRNAs, the virus systematically escaped RNAi after 3 to 20 consecutive passages. The genetic modifications involved consisted of single or multiple point nucleotide mutations and a deletion of a stretch of six nucleotides, illustrating this virus has an unusual genomic malleability.

### FOOTNOTES

\* Corresponding author: [renata.servan\\_de\\_almeida@cirad.fr](mailto:renata.servan_de_almeida@cirad.fr), CIRAD - Département Systèmes Biologiques, UPR 15 - Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes, TA A-15/G (bureau G 217), Tél: +33 4 67 59 37 24 Poste 4247, Fax: +33 4 67 59 37 98, Campus International de Baillarguet, 34398 MONTPELLIER Cedex 5, FRANCE





## Short communication

## Potential of adenovirus and baculovirus vectors for the delivery of shRNA against morbilliviruses

Zaheer Ahmed Nizamani<sup>a</sup>, Gunther M. Keil<sup>b</sup>, Emmanuel Albina<sup>a</sup>, Carine Holz<sup>a</sup>, Cécile Minet<sup>a</sup>, Olivier Kwiatak<sup>a</sup>, Geneviève Libeau<sup>a,\*</sup>, Renata Servan de Almeida<sup>a</sup>

<sup>a</sup> CIRAD, UMR Contrôle des Maladies, Montpellier F-34398, France

<sup>b</sup> Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald-Insel Riems, Germany

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 27 July 2010

Received in revised form 17 January 2011

Accepted 18 February 2011

Available online 26 February 2011

## Keywords:

RNAi

Morbillivirus

Adenovirus

Baculovirus

PPRV

## ABSTRACT

Morbilliviruses are important pathogens of humans, ruminants, carnivores and marine mammals. Although good vaccines inducing long-term immunity are available, recurrent outbreaks of measles, canine distemper and peste des petits ruminants (PPR) are observed. In control strategies, antivirals thus could be useful to confine virus spread and application of interfering RNAs is a promising approach, provided they can be delivered efficiently into the host cells. We have constructed recombinant adenovirus and baculovirus vectors expressing short hairpin RNAs (shRNAs) against the PPR virus (PPRV) and compared them *in vitro*. It was found that both recombinant viruses inhibited PPRV replication with the baculovirus vector, which inhibited generation of infectious progeny by more than 2 log<sub>10</sub> and the nucleoprotein expression of PPRV by 73%, being the more efficient. The results show that baculoviral shRNA-expressing vectors have the potential for therapeutic use against morbillivirus infections.

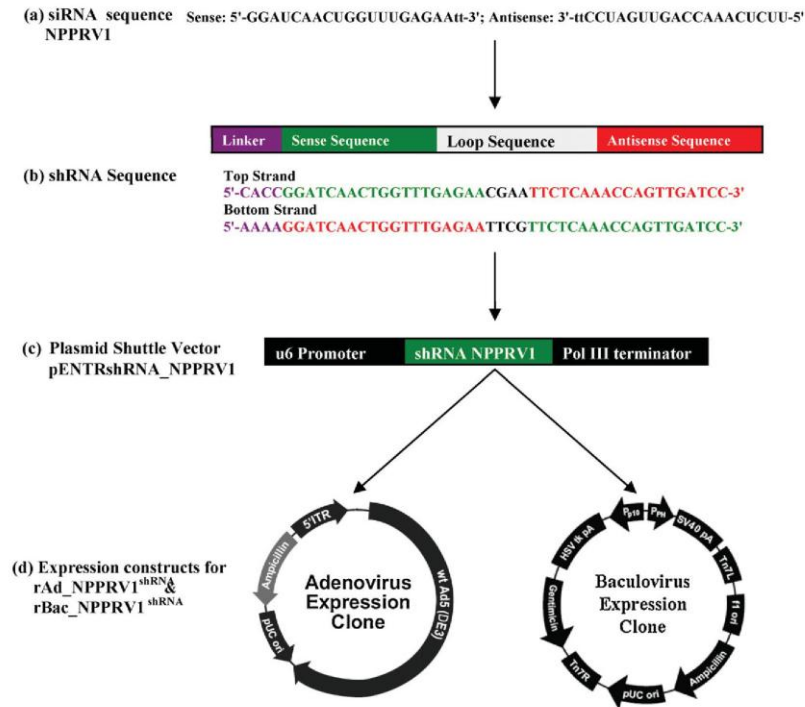
© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

RNA interference (RNAi) is an evolutionarily conserved post transcriptional gene silencing mechanism (Fire et al., 1998; Zhang et al., 2004; Aagaard and Rossi, 2007). RNAi has potential for being used as an effective antiviral therapy if siRNAs or short-hairpin RNAs (shRNAs) can be delivered efficiently into the target cells. Morbilliviruses are important pathogens of humans, ruminants, carnivores and marine mammals. Good vaccines inducing long-term immunity are available against measles, rinderpest, peste des petits ruminants (PPR) and canine distemper. However, the vaccination coverage is often only partial and recurrent outbreaks of measles, canine distemper and PPR are observed. In order to develop an antiviral strategy against these diseases, we previously designed siRNA sequences targeting the nucleoprotein (N) gene of PPR virus (PPRV), rinderpest virus and measles virus. Their efficacy was demonstrated *in vitro* after delivery by liposome-based transfection (Keita et al., 2008; Servan de Almeida et al., 2007). Three sequences directed against the N gene were shown to be most effective. Therapeutic application of siRNA requires correct delivery of these molecules into the cell cytoplasm which poses significant problems *in vivo*. To overcome these problems, several delivery strategies have been developed, including those based on viral vectors. Recombinant replication deficient adenoviruses have

been successfully used *in vitro* as shRNA delivery vectors against numerous viruses including measles virus (Uprichard et al., 2005; Otaki et al., 2007; Sakamoto et al., 2008) and also *in vivo* (Kim et al., 2008; Feng et al., 2008; Li et al., 2009). Adenoviruses have advantages over other viral vectors as they can be produced in high titers and can transduce a broad range of cell types (Volpers and Kochanek, 2004). In contrast, baculoviruses like *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV), only replicate in insect cells and naturally infect insects belonging to the order *Lepidoptera*. However, they can enter mammalian cells but do not express their genes because the baculovirus promoters are inactive in these cells. One of the interesting consequences of this is the absence of pre-existing antibodies against baculovirus in mammals (Kost and Condreay, 2002; Volkman and Goldsmith, 1983). For gene transfer and expression in mammalian cells, so-called BacMam viruses have been generated by incorporation of mammalian cell-active expression cassettes (Brun et al., 2008). BacMam viruses are capable to transduce a wide variety of cells including non-dividing cells (van Loo et al., 2001) and primary cells (Sarkis et al., 2000). They have also been used as shRNA expression vectors against viral infections *in vitro* (Lu et al., 2006; Suzuki et al., 2008, 2009; Starkey et al., 2009). In this study, a recombinant replication deficient human adenovirus type 5 and a recombinant baculovirus expressing a short hairpin RNA (shRNA) against PPRV were compared for their antiviral efficacy *in vitro*.

Recombinant adenovirus expressing shRNA NPPRV1 (rAd.NPPRV1<sup>shRNA</sup>) was constructed using the commercial kit

\* Corresponding author. Tel.: +33 467593850; fax: +33 467593798.  
E-mail address: [genevieve.libeau@cirad.fr](mailto:genevieve.libeau@cirad.fr) (G. Libeau).



**Fig. 1.** Schematic presentation of (a) siRNA NPPRV1 sequence, (b) shRNA sequence, (c) plasmid shuttle vector, and (d) expression plasmids for rAd.NPPRV1<sup>shRNA</sup> and rBac.shRNA.NPPRV1.

BLOCK-IT<sup>TM</sup> Adenoviral RNAi Expression System according to the supplier's instructions (Invitrogen). For constructing recombinant baculovirus expressing shRNA against PPRV, an insect cell-active GFP-expression cassette was integrated into the commercially available pFastBaDual to yield plasmid pBacPH.GFPpolyA (Keil et al., 2009). This plasmid was used to integrate a blunt ended BsrG1 fragment (400 bp) from pENTR/U6/NPPRV1<sup>shRNA</sup> (Fig. 1). The resulting plasmid pBacPH.GFP.NPPRV1<sup>shRNA</sup> was used to generate the recombinant baculovirus (rBac.NPPRV1<sup>shRNA</sup>), as recommended in the Bac-to-Bac<sup>®</sup> Baculovirus Expression Systems kit (Invitrogen).

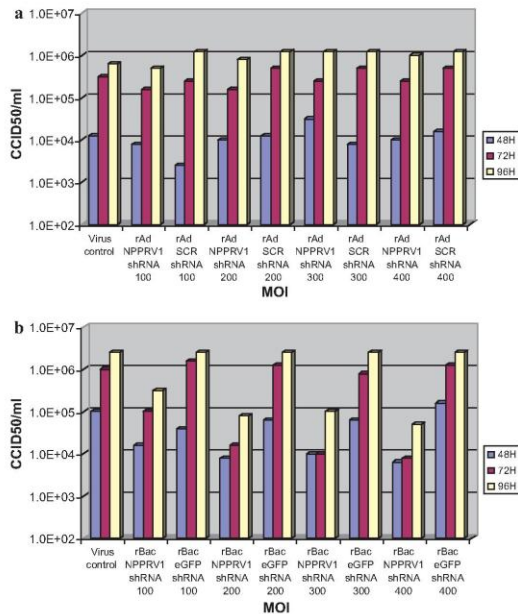
Transductions were performed on Vero cells after 24 h of culture in 24-well plates. The rAd.NPPRV1<sup>shRNA</sup> and an adenovirus expressing scrambled shRNA (Vector Biolabs) rAd5.SCR<sup>shRNA</sup> were added at MOI 100, 200, 300, and 400 and the plates were further incubated overnight at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Inocula were removed and 1 ml of Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) with 5% of fetal bovine serum was added to each well. For baculovirus transductions, the culture medium was removed and the cells were washed twice with Dulbecco's phosphate-buffered saline containing calcium and magnesium (Sigma–Aldrich). Then, rBac.NPPRV1<sup>shRNA</sup> and, as a control, rBac.eGFP<sup>shRNA</sup> were added to the wells at MOIs of 100, 200, 300 and 400. The plates were incubated for 30 min at 27 °C under agitation (100 rpm) and then centrifuged at 27 °C for 1 h at 600 × g. Inocula were discarded and 1 ml EMEM was added to each well. Cells were finally infected with PPRV (MOI 0.1), 24–72 h post-transduction. To assess the antiviral effect, cytopathic effects (CPE) were scored from 0 to 100%, at 72 and 96 h

post-infection. In addition, cell supernatants were collected 48, 72 and 96 h post-infection. Since CPE were consistently seen from 72 h post-infection, they were scored from 0 to 100% at 72 and 96 h post-infection. In contrast, virus titers could be determined as early as 48 h post-infection. The supernatants were titrated using 10-fold serial dilutions according to Reed and Muench (1938). Viral titers were expressed in terms of 50% cell culture infectious unit dose per ml (CCID<sub>50</sub>/ml). The relative expression of PPRV nucleoprotein was also measured 96 h post-infection by flow cytometry as described by Servan de Almeida et al. (2007).

The maximum antiviral effect of rAd.NPPRV1<sup>shRNA</sup>, observed at an MOI of 200 and 72 h after PPRV infection, reached CPE reductions of 25% and a decrease in viral progeny production of 0.5 log<sub>10</sub>, respectively (Table 1 and Fig. 2). Transduction with

**Table 1**  
Effect of rBac.NPPRV1<sup>shRNA</sup> and rAd.NPPRV1<sup>shRNA</sup> upon percentage of CPE induction by PPRV at 72 h and 96 h post-infection.

	72 h	96 h
Virus control	75	100
rBac.NPPRV1 <sup>shRNA</sup> MOI 100	25	50
rBac.NPPRV1 <sup>shRNA</sup> MOI 200	25	25
rBac.NPPRV1 <sup>shRNA</sup> MOI 300	25	25
rBac.NPPRV1 <sup>shRNA</sup> MOI 400	12.5	25
Virus control	100	100
rAd.NPPRV1 <sup>shRNA</sup> MOI 100	75	100
rAd.NPPRV1 <sup>shRNA</sup> MOI 200	75	100
rAd.NPPRV1 <sup>shRNA</sup> MOI 300	75	100



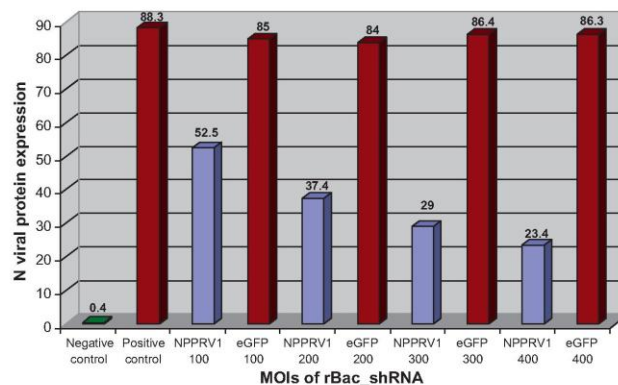
**Fig. 2.** Inhibition of PPRV progeny virus production by (a) rAd\_NPPRV1<sup>shRNA</sup> and (b) rBac\_NPPRV1<sup>shRNA</sup> 48, 72 and 96 h post-infection with PPRV MOI of 0.1. Viral titers are expressed in terms of 50% cell culture infectious unit dose per ml (CCID<sub>50</sub>/ml).

higher MOIs did not improve inhibition of PPRV replication but had a deleterious effect on the cell culture which could be seen in the form of rounding and detachment of the cells. In contrast, rBac\_NPPRV1<sup>shRNA</sup> inhibited the PPRV CPE up to 75% and reduced PPRV progeny virus titers by more than 2 log<sub>10</sub> at 96 h post-infection (Table 1 and Fig. 3). No toxic effect was observed in cells transduced with rBac\_NPPRV1<sup>shRNA</sup> even using the higher MOI of 400. This inhibitory effect on PPRV replication was reflected by the up to 73% reduction of PPRV nucleoprotein expression

by rBac\_NPPRV1<sup>shRNA</sup> transduction (Fig. 3). No difference in CPE expression by PPRV was found between virus control and cells transduced with the two recombinant viruses expressing irrelevant or scrambled shRNA.

This study provides evidence that recombinant adenoviruses or baculoviruses expressing active shRNAs can interfere with the replication of PPRV. However, the baculovirus proved to be more efficient than adenovirus when used at same MOIs. The low efficiency of the adenovirus against PPRV replication differs from studies in which other pathogens were targeted. *In vitro*, shRNA-expressing adenoviruses achieved titer reductions of 3 log<sub>10</sub> and 1.39 log<sub>10</sub> for porcine picornavirus and circovirus when used at MOIs of 80 and 1000, respectively (Kim et al., 2008; Feng et al., 2008). In contrast, rAd\_NPPRV1<sup>shRNA</sup> did not reduce PPRV titers more than 0.5 log<sub>10</sub>. In contrast, our recombinant baculovirus showed a reduction of 2 log<sub>10</sub> on PPRV infectious replication. In comparable studies, Lu et al. (2006) and Suzuki et al. (2009) reported a decrease in titer for a porcine arterivirus and human influenza viruses to a maximum of 0.6 and 0.9 log<sub>10</sub>, respectively, which is at least 1 log<sub>10</sub> less than in the present study. In addition, the results obtained with rBac\_NPPRV1<sup>shRNA</sup> are in accordance to those previously reported by our group when siRNA delivered to cell cultures by Lipofectamine<sup>TM</sup> reduced the PPRV infectious progeny titer by 3–4 log<sub>10</sub> and PPRV nucleoprotein expression by 90% (Keita et al., 2008).

Compared to liposomes, recombinant baculoviruses are not aggregated and degraded by serum proteins (Li et al., 1999) and they are easier and cheaper to produce in large quantities. However, they are susceptible to complement inactivation (Hofmann and Strauss, 1998). Chemical or genetic modification, can overcome this problem (Kaname et al., 2010; Yang et al., 2009). Furthermore, it seems that baculoviruses do not have deleterious effects on mammalian cells even when used at very high MOIs (Andersson et al., 2007). In agreement with this report and in contrast to rAd\_NPPRV1<sup>shRNA</sup> transduction, we did not find adverse effects in Vero cells even when transduced at an MOI of 400. In conclusion, a recombinant replication deficient adenovirus and a baculovirus expressing shRNA against nucleoprotein of PPRV were constructed and tested *in vitro*. This study shows that both recombinants can inhibit PPRV replication *in vitro*, however, the baculovirus vector was more efficient whether rBac\_NPPRV1<sup>shRNA</sup> is suitable for inhibition of PPRV replication also *in vivo* needs to be elucidated.



**Fig. 3.** Inhibition of nucleoprotein expression of PPRV by rBac\_NPPRV1<sup>shRNA</sup> measured by flow cytometry.



## Acknowledgements

This work was supported by EPIZONE, and a PhD scholarship from Higher Education Commission (HEC), Pakistan.

## References

- Aggaard, L., Rossi, J.J., 2007. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 75–86.
- Andersson, M., Warolen, M., Nilsson, J., Selander, M., Sterky, C., Bergdahl, K., Sorving, C., James, S.R., Doverskog, M., 2007. Baculovirus-mediated gene transfer and recombinant protein expression do not interfere with insulin dependent phosphorylation of PKB/Akt in human SHSY-5Y and C3A cells. *BMC Cell Biol.* 8, 6.
- Brun, A., Albina, E., Barret, T., Chapman, D.A., Czub, M., Dixon, L.K., Keil, G.M., Klonjowski, B., Le Potier, M.F., Libeau, G., Ortego, J., Richardson, J., Takamatsu, H.H., 2008. Antigen delivery systems for veterinary vaccine development. Viral-vector based delivery systems. *Vaccine* 26, 6508–6528.
- Feng, Z., Jiang, P., Wang, X., Li, Y., Jiang, W., 2008. Adenovirus-mediated shRNA interference against porcine circovirus type 2 replication both in vitro and in vivo. *Antivir. Res.* 77, 186–194.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.
- Hofmann, C., Strauss, M., 1998. Baculovirus-mediated gene transfer in the presence of human serum or blood facilitated by inhibition of the complement system. *Gene Ther.* 5, 531–536.
- Kaname, Y., Tani, H., Kataoka, C., Shiokawa, M., Tagawa, S., Abe, T., Moriishi, K., Kinoshita, T., Matsuura, Y., 2010. Acquisition of complement resistance through incorporation of CD55/decay-accelerating factor into viral particles bearing baculovirus GP64. *J. Virol.* 84, 3210–3219.
- Keil, G.M., Klopffleisch, C., Giesow, K., Blohm, U., 2009. Novel vectors for simultaneous high-level dual protein expression in vertebrate and insect cells by recombinant baculoviruses. *J. Virol. Methods* 160, 132–137.
- Keita, D., Servan de Almeida, R., Libeau, G., Albina, E., 2008. Identification and mapping of a region on the mRNA of Morbillivirus nucleoprotein susceptible to RNA interference. *Antivir. Res.* 80, 158–167.
- Kim, S.M., Lee, K.N., Park, J.Y., Ko, Y.J., Joo, Y.S., Kim, H.S., Park, J.H., 2008. Therapeutic application of RNA interference against foot-and-mouth disease virus in vitro and in vivo. *Antivir. Res.* 80, 178–184.
- Kost, T.A., Condreay, J.P., 2002. Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. *Trends Biotechnol.* 20, 173–180.
- Li, G., Jiang, P., Li, Y., Wang, X., Huang, J., Du, Y., Zeshan, B., 2009. Effective suppression of replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by adenovirus-mediated small interfering RNAs targeting ORF1b, 5 and 7 genes. *J. Virol. Methods* 157, 40–46.
- Li, S., Tseng, W.C., Stolz, D.B., Wu, S.P., Watkins, S.C., Huang, L., 1999. Dynamic changes in the characteristics of cationic lipidic vectors after exposure to mouse serum: implications for intravenous lipofection. *Gene Ther.* 6, 585–594.
- Lu, L., Ho, Y., Kwang, J., 2006. Suppression of porcine arterivirus replication by baculovirus-delivered shRNA targeting nucleoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340, 1178–1183.
- Otaki, M., Jiang, D.P., Sasayama, M., Nagano-Fujii, M., Hotta, H., 2007. Generation of recombinant adenovirus expressing siRNA against the L mRNA of measles virus and subacute sclerosing panencephalitis virus. *Microbiol. Immunol.* 51, 985–991.
- Reed, L.J., Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* 27, 493–497.
- Sakamoto, N., Tanabe, Y., Yokota, T., Satoh, K., Sekine-Osajima, Y., Nakagawa, M., Itsui, Y., Tasaka, M., Sakurai, Y., Cheng-Hsin, C., Yano, M., Ohkoshi, S., Aoyagi, Y., Maekawa, S., Enomoto, N., Kohara, M., Watanabe, M., 2008. Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 23, 1437–1447.
- Sarkis, C., Serguera, C., Petres, S., Buchet, D., Ridet, J.L., Edelman, L., Mallet, J., 2000. Efficient transduction of neural cells in vitro and in vivo by a baculovirus-derived vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 14638–14643.
- Servan de Almeida, R., Keita, D., Libeau, G., Albina, E., 2007. Control of ruminant morbillivirus replication by small interfering RNA. *J. Gen. Virol.* 88, 2307–2311.
- Starkey, J.L., Chiari, E.F., Isom, H.C., 2009. Hepatitis B virus (HBV)-specific short hairpin RNA is capable of reducing the formation of HBV covalently closed circular (CCC) DNA but has no effect on established CCC DNA in vitro. *J. Gen. Virol.* 90, 115–126.
- Suzuki, H., Saitoh, H., Suzuki, T., Takaku, H., 2009. Inhibition of influenza virus by baculovirus-mediated shRNA. *Nucl. Acids Symp. Ser. (Oxf.)* 287–288.
- Suzuki, H., Tamai, N., Shimotohno, K., Matsuura, Y., Takaku, H., 2008. Suppression of HCV RNA replication by baculovirus-mediated shRNA expression vectors. *Antivir. Res.* 78, A49–A49.
- Uprichard, S.L., Boyd, B., Althage, A., Chisari, F.V., 2005. Clearance of hepatitis B virus from the liver of transgenic mice by short hairpin RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 773–778.
- van Loo, N.D., Fortunati, E., Ehlert, E., Rabelink, M., Grosveld, F., Scholte, B.J., 2001. Baculovirus infection of nondividing mammalian cells: mechanisms of entry and nuclear transport of capsids. *J. Virol.* 75, 961–970.
- Volkman, L.E., Goldsmith, P.A., 1983. In Vitro Survey of Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus Interaction with Nontarget Vertebrate Host Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1085–1093.
- Volpers, C., Kochanek, S., 2004. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J. Gene Med.* 6 (Suppl. 1), S164–171.
- Yang, Y., Lo, S.L., Yang, J., Goh, S.S., Wu, C., Feng, S.S., Wang, S., 2009. Polyethylenimine coating to produce serum-resistant baculoviral vectors for in vivo gene delivery. *Biomaterials* 30, 5767–5774.
- Zhang, H., Kolb, F.A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., Filipowicz, W., 2004. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 118, 57–68.

## **Dynamique de l'émergence *in vitro* des mutants d'échappement du virus de la peste des petits ruminants (PPRV) face à l'activité ARN interférente ciblant le gène de la nucléoprotéine : implications pour les stratégies thérapeutiques**

Les membres du genre *Morbillivirus*, famille *Paramyxoviridae* sont responsables de graves maladies chez l'homme et les animaux, comme la rougeole, la peste bovine (RP) et la peste des petits ruminants (PPR). Malgré l'existence de vaccins efficaces contre ces maladies, des traitements spécifiques sont souhaitables. L'inhibition de la réplication de ces virus peut être acquise par interférence ARN (ARNi), un mécanisme d'inhibition post-transcriptionnel déclenché par des séquences courtes d'ARN double-brin (siARN). Le Cirad a précédemment identifié 3 siARNs ciblant des régions conservées du gène de la nucléoprotéine virale capables d'inhiber au moins 80% de la réplication *in vitro* des virus de la rougeole, de la RP et de la PPR. Cependant, un problème majeur dans la stratégie d'ARNi est le risque d'apparition de virus résistants. Dans cette étude, nous avons évalué le risque d'apparition de mutants d'échappement du virus de la PPR sous pression de sélection de 3 siARNs appliqués seul ou en association après plusieurs transfections successives *in vitro*. Excepté pour la combinaison des 3 siARNs, le virus a échappé à l'ARNi après 3 à 20 passages consécutifs, avec des mutations simples ou multiples (synonymes ou pas) ou une délétion de 6 nucléotides dans la zone cible des siARN. Ces résultats mettent en évidence une plasticité génomique inattendue des morbillivirus surtout illustrée par cette délétion non-délétère d'une partie significative d'un gène viral essentiel, qui devrait être considérée comme un obstacle à l'utilisation de l'ARNi comme thérapie antivirale. Cependant, l'utilisation combinée de 3 siARNs peut être proposée pour diminuer le risque d'échappement aux siARNs.

---

**MOTS CLES :** Morbillivirus, virus de la peste des petits ruminants (PPRV), interférence ARN (ARNi), siARN, virus d'échappement, thérapie antiviral, malleabilité génomique.

---

### **Dynamics of the *in vitro* emergence of escape mutants of the peste des petits ruminants virus (PPRV) to interfering RNAs targeting the nucleoprotein gene: implications for therapeutics**

Viruses in the genus *Morbillivirus*, within the family *Paramyxoviridae* are responsible for severe humans and animal diseases, including measles, rinderpest (RP) and peste des petits ruminants (PPR). In spite of the existence of efficient vaccines against these diseases, specific treatments to be applied when the *infection is already present* are desirable. Inhibition of morbillivirus replication can be achieved by RNA interference (RNAi), a mechanism of post-transcriptional gene silencing triggered by small double-stranded RNA (siRNA). The Cirad previously identified three siRNAs that target conserved regions of the essential gene encoding the viral nucleoprotein and are able to prevent *in vitro* at least 80% of the replication of measles, RP and PPR viruses. However, a major problem in RNAi is the important risk of emergence of escape mutants. In this study, we investigated the ability of PPR virus to escape the inhibition conferred by single or multiple siRNAs after several consecutive transfections *in vitro*. Except with the combination of the three different siRNAs, the virus systematically escaped RNAi after 3 to 20 consecutive passages. The mutations were characterized by either single or multiple punctual nucleotide mutations (synonymous or not) or a deletion of a stretch of 6 nucleotides into the siRNA target. These results demonstrate that the genomic plasticity of morbilliviruses, illustrated mainly by this significant and non-deleterious deletion in an essential viral gene, should be considered as an obstacle to the use of RNAi in antiviral therapy. However, the combined use of three siRNAs can be proposed to prevent treatment failure with siRNAs.

---

**KEYWORDS:** Morbillivirus, peste des petits ruminants virus (PPRV), RNA interference (RNAi), siRNA, escape virus, antiviral therapy, genomic malleability.

---

**Carine L. HOLZ**

**Laboratoire :** Cirad – Département Systèmes Biologiques, UMR 15 “Contrôle des Maladies Animales Exotique et Emergentes”, équipe de virologie, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier, cedex 5, France.